

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE D'UN BACILLE TUBERCULEUX D'ORIGINE HUMAINE CULTIVÉ PENDANT VINGT-DEUX ANNÉES CONSÉCUTIVES SUR MILIEU BILIÉ

par A. CALMETTE, C. GUÉRIN et L. NÈGRE.

(*Institut Pasteur.*)

On sait que le vaccin préventif de la tuberculose dit BCG est un bacille tuberculeux d'origine *bovine*, de virulence artificiellement atténuée.

Parallèlement aux recherches poursuivies sur ce bacille et qui ont conduit à l'obtention du BCG, deux d'entre nous ont appliqué les mêmes procédés d'atténuation à une souche d'origine humaine rapportée en 1908 du laboratoire Trudeau à Saranac (N. Y.). Cette souche était de virulence moyenne : 1/100 de milligramme tuait ou tuberculisait gravement le cobaye en soixante jours.]

Ensemencée sur le milieu pomme de terre + bile de bœuf, elle se développait fort péniblement et ne donnait que de rares colonies grêles. Nous eûmes alors l'idée de remplacer la bile de bœuf par de la bile humaine que nous avons pu nous pro-

curer assez abondante en vidant le contenu des vésicules de quatre condamnés à mort, exécutés le même jour. Cette substitution nous donna d'emblée des cultures beaucoup plus riches (1).

Le 10 mars 1910 nous remplaçâmes de nouveau la bile humaine par de la bile de bœuf et, à partir de cette date, les réensemencements furent effectués sans interruption, d'abord toutes les deux, puis toutes les trois semaines. Dès le quatrième report sur pomme de terre + bile de bœuf, la culture s'était adaptée, devenait plus vigoureuse, s'étalant en couche uniforme, épaisse, luisante, de couleur gris-verdâtre, sans jamais former de voile sur la bile glycinée à 5 p. 100 qui garnissait le fond des tubes. Au 31 décembre 1932, après vingt-deux ans, 418 cultures successives avaient été ainsi effectuées.

A la vingtième culture, comme on l'avait observé pour le bacille bovin, la virulence paraissait exaltée pour le cobaye et pour le lapin : 1/100 de milligramme dans le péritoine du cobaye provoquait en vingt jours des lésions énormes de l'épiploon où fourmillaient des bacilles disposés en amas feutrés. La rate, triplée de volume, était farcie de bacilles. Une dose de 1/10 de milligramme, injectée dans les veines du lapin, tuait cet animal en quinze à vingt jours par septicémie « type Yersin ».

A la trente-cinquième culture, la virulence faiblissait pour le cobaye et le lapin.

A la deux cent sixième culture, qui remonte à l'année 1921, la dose de 1 milligramme était devenue complètement avirulente pour ces deux espèces de rongeurs. Reportée alors sur pomme de terre glycinée ordinaire, elle reprit l'aspect du bacille tuberculeux normal tout en demeurant avirulente. Depuis, ses caractères n'ont subi aucune variation, soit après culture continue sur bile, jusqu'à la quatre cent dix-huitième, soit après culture sur pomme de terre ordinaire. Mais elle se différencie très nettement du BCG d'origine bovine en ce qu'elle est beaucoup plus grasse, plus adhérente à la spatule de platine, plus épaisse et plus collante.

(1) *C. R. Acad. des Sciences*, 147, 1908, p. 1456.

*
* *

L'étude expérimentale de cette souche a été effectuée suivant les mêmes protocoles que nous avons établis avec A. Boquet pour le BCG (1). Elle a comporté de nombreuses séries de recherches que nous résumons ci-après.

I. — EFFETS DES INOCULATIONS PAR LES DIFFÉRENTES VOIES
AU COBAYE ET AU LAPIN.

De nombreuses séries d'animaux ont reçu sous la peau, dans le péritoine, ou directement par voie intracardiaque, des doses variables des cultures n^{os} 387, 388 et 389 : de 1 à 20 milligrammes sous la peau ; de 1 à 10 milligrammes dans le péritoine ; de 1 à 5 milligrammes dans le cœur.

Les résultats constatés sont les suivants :

a) *Inoculations sous-cutanées* : déterminent une hypertrophie transitoire des ganglions inguinaux qui ne se caséifient pas. Cette hypertrophie régresse en deux à trois mois. Les fortes doses produisent un abcès dont le pus fourmille de bacilles acido-résistants. Aucune lésion viscérale, même chez les cobayes inoculés depuis plus d'un an.

b) *Inoculations intra-péritonéales* : toujours inoffensives jusqu'à 10 milligrammes. Les animaux sacrifiés ou morts d'affections intercurrentes dans les semaines qui suivent présentent des nodules épiploïques et des ganglions mésentériques hypertrophiés. Ces lésions disparaissent. Aucune extension aux viscères, même après une année.

c) *Inoculations intra-cardiaques* : la dose de 1 milligramme est inoffensive ; 5 milligrammes provoquent de l'hypertrophie ganglionnaire transitoire. Pas de lésions visibles chez les animaux inoculés depuis plus d'un an.

Chez les lapins, l'inoculation intraveineuse de 1, 10 et 20 milligrammes ne détermine aucune lésion évolutive. Après plus d'un an les animaux demeurent indemnes. Ceux qui sont sacrifiés pendant le premier mois présentent sur les poumons

(1) Ces *Annales*, 25, septembre 1921 ; 36, septembre 1922 ; 38, mai 1924.

de petites lésions nodulaires qui disparaissent dans la suite sans laisser de traces.

II. — RÉACTIONS ALLERGIQUES.

Les doses de 1 à 20 milligrammes sensibilisent les animaux à la tuberculine et l'état allergique persiste plus d'une année chez le cobaye, environ sept mois chez le lapin. Il met en général entre deux et trois mois à s'établir, même avec les fortes doses. La dose limite sensibilisante a été, dans nos expériences, de 0 milligr. 0001 de bacilles.

III. — POUVOIR ANTIGÈNE « IN VITRO » ET « IN VIVO ».

L'étude *in vitro* a été faite à plusieurs reprises en partant d'émulsions titrées à 0 milligr. 1 et 1 milligramme de culture par centimètre cube. 1 cent. cube de chaque émulsion était mis en contact avec 0 c. c. 2 d'un sérum antituberculeux de titre connu en anticorps, et de doses croissantes d'alexine au 1/15 selon la technique de Calmette-Massol.

Avec 0 milligr. 1 il n'y a pas de fixation. Par contre, 1 milligramme a fixé deux doses minima hémolytiques d'alexine.

Le même résultat a été obtenu avec des émulsions de BCG d'égale richesse en corps microbiens.

Pour la recherche du pouvoir antigène *in vivo*, nous avons injecté à des lapins, respectivement, 0 milligr. 1 et 1 milligramme de bacilles Saranac des mêmes souches indiquées ci-dessus (n^{os} 387 à 389). Les animaux furent saignés deux semaines après. Leur sérum, titré, contenait respectivement 5 et 10 unités d'anticorps. Le BCG fournit les mêmes résultats.

IV. — POUVOIR PRÉMUNISANT.

Les cobayes qui avaient reçu par voie sous-cutanée 20 milligrammes des cultures Saranac n^{os} 396 et 403 ont été éprouvés deux mois plus tard, en même temps que des témoins en nombre égal, par inoculation sous-cutanée de 0 milligr. 001 de tuberculose virulente Bovine Vallée, ou de 0 milligr. 0001 d'une souche virulente humaine. Tous les animaux sacrifiés

deux mois après l'épreuve montrent chez les prémunis des lésions beaucoup plus localisées, moins étendues et non progressives, alors que les témoins ont de grosses lésions caséuses et une tuberculose généralisée à tous les viscères.

Les lapins prémunis par inoculation intraveineuse de 15 milligrammes de culture Saranac n° 400, éprouvés deux mois plus tard par la même voie veineuse avec 0 milligr. 001 de bacilles bovins virulents, en même temps qu'un nombre égal de témoins, présentent, lorsqu'on les sacrifie deux mois après l'épreuve, des lésions incomparablement moindres que celles des témoins. On ne trouve chez les prémunis que quelques rares petits nodules sur les poumons, tandis que chez les témoins ces nodules sont très nombreux.

CONCLUSIONS.

Ces expériences montrent qu'en appliquant à une souche de bacilles d'origine *humaine*, dite *Saranac*, la méthode de culture en milieu très alcalin (en l'espèce bile de bœuf pure) que deux d'entre nous avaient utilisée pour obtenir le BCG, on peut faire perdre progressivement à cette souche, après environ 200 cultures successives sur bile de bœuf, toute sa virulence initiale pour les animaux sensibles.

La souche « Saranac » constitue actuellement, à sa *quatre cent dix-huitième* culture, une race de bacilles d'origine humaine dont les propriétés antigènes et prémunisantes apparaissent sensiblement équivalentes à celles du BCG.

Il n'entre aucunement dans nos intentions de nous en servir comme vaccin préventif de la tuberculose chez les enfants, puisque le BCG continue à fournir, partout où on l'emploie, les résultats les plus satisfaisants. Mais nous croyons intéressant de poursuivre, parallèlement avec le BCG, l'entretien de cette souche afin de vérifier de temps en temps la stabilité de son comportement, soit vis-à-vis des milieux de culture, soit vis-à-vis des animaux d'expériences.

DIVERSITÉ DES PRINCIPES AUTOLYTIQUES

par ERNEST RENAUX.

(*Université de Bruxelles, Laboratoire de Bactériologie*).

Dans le numéro de ces *Annales* de mars dernier, figure une note de A. Gratia où cet auteur exprime l'opinion que ses travaux concernant l'hétérogénéité des principes lytiques ont été mal interprétés par divers auteurs, notamment Bordet et Renaux. (Ces *Annales*, novembre 1932.)

Comme on ne peut laisser passer un reproche injustifié, il est nécessaire de revenir brièvement sur cette question de la diversité des principes, sur son historique et notamment sur l'étude du principe faible décrit par Bordet et Ciuca et par Bordet.

Ainsi que Bordet le signale (1), l'expérience la plus simple permettant d'obtenir le principe faible aux dépens du principe total originel anti-*coli* consiste à étaler sur gélose une goutte d'un bouillon ensemencé de *B. coli* et que l'on a, peu de temps auparavant, additionné d'une trace de ce principe total (2). Dans ces conditions, le contact entre les microbes et le principe ayant été bref, seuls les germes les plus susceptibles d'entrer très vite en réaction avec le principe sont impressionnés. Il en résulte que les taches de lyse qui apparaissent sont rares et que, déterminées par un principe spécial, différent du principe total en ce sens qu'il n'entrave pas le développement des microbes du type *Rough*, elles se recouvrent bientôt de colonies résistantes de ce type. En repiquant en bouillon l'une de ces taches, on peut étudier le principe en question ainsi obtenu à l'état pur. On constate que, très actif à l'égard du type diffus (*Smooth*), il respecte le type agglutiné (*Rough*). C'est pourquoi

(1) BORDET. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 87, 1922, p. 987.

(2) Dans le résumé qu'il fait des travaux de Bordet et Ciuca et de Bordet, Gratia ne mentionne pas que l'extraction du principe faible a été effectuée par cette technique, pourtant la plus démonstrative. Le repiquage des taches clarifiées fut d'ailleurs pratiqué par tous les chercheurs depuis le début des expériences sur le bactériophage.

ce principe, introduit dans du bouillon ensemencé de la culture ordinaire de *B. coli* (contenant comme d'habitude les deux types), supprime le type *S*, mais permet l'abondant développement du type *R* réfractaire. A l'inverse du principe initial, ce principe est donc incapable de clarifier la culture de *B. coli*. C'est pour cette raison que Bordet l'appela *principe faible*. Mais il précise, dans ses deux notes (1), la signification qu'il donne à ce qualificatif : le principe faible en question supporte la dilution aussi bien que le principe fort ; il agit encore à des dilutions extrêmes, mais il agit toujours faiblement, qu'il soit dilué ou qu'il soit concentré. Cela signifie bien que le terme « faible » est choisi en raison du fait que ce principe ne s'attaque qu'à une certaine catégorie des germes contenus dans la culture primitive, par opposition au principe initial qui agit sur la culture entière.

Gratia conteste la légitimité de ce qualificatif « faible » parce que ce principe agit très énergiquement sur le type *Smooth*, ce que Bordet indique lui-même dès le début. Mais il est clair que, lorsqu'on discute une appellation, il faut la comprendre dans le sens que celui qui l'a proposée lui a attribué. Il n'est pas déraisonnable de dire qu'un principe qui n'attaque qu'une seule race est moins puissant que celui qui en attaque deux. Au surplus, les mots ne changent pas les faits.

Ces recherches de Bordet mettaient en lumière une notion neuve et intéressante, à savoir qu'un principe déterminé respecte un des types microbiens (en l'occurrence, le type agglutiné) présents communément dans les cultures, et qu'il existe donc un rapport remarquable entre l'individualité du principe et les types microbiens attaqués. A vrai dire, cette notion n'a pu être étendue davantage dans la suite, l'autre principe ne manifestant pas cette exclusivité d'action.

Mais, puisque le principe initial est capable de lyser la culture totale et par conséquent le type *Rough*, il faut, de toute évidence, qu'il contienne encore autre chose que le principe faible extrait par Bordet. Gratia, reprenant le même matériel, principes et cultures, et utilisant la technique d'isolement sur gélose réussit à extraire (2), outre le principe faible déjà

(1) C. R. de la Soc. de Biologie, 87, 1922, p. 366 et 989.

(2) GRATIA. C. R. de la Soc. de Biologie, 89, 1923, p. 821.

décrit, un principe se différenciant de celui-ci parce qu'il attaque le type *Rough*. Il fit une constatation très propice à l'isolement, à savoir que les deux agents lytiques se distinguent par l'aspect des taches qu'ils engendrent sur gélose : le principe faible produit de grandes taches, l'autre de petites taches. Gratia retrouvait ainsi, pour le principe étudié à notre Institut, les constatations de Bail (1921) et d'Asheshov (1922) d'après lesquelles un principe total peut contenir deux principes respectivement à grandes et à petites taches et que l'on peut séparer.

Telle est la suite des expériences successives. Bordet eut soin, d'ailleurs, de rappeler cet historique dès qu'il publia un nouveau mémoire sur ces questions (1), et rappela, notamment (p. 747), la constatation de Gratia d'après laquelle il suffit, pour obtenir, soit l'un, soit l'autre des deux principes, de repiquer des taches de dimensions différentes.

Le second principe (principe à petites taches isolé par Gratia) lyse les deux races du *B. coli* (et même le *B. dysentérique*). C'est pourquoi Bordet (conservant pour le principe de départ le qualificatif « initial » ou « total ») lui réserve l'appellation de *principe fort* par opposition au *principe faible* qui ne lyse qu'une des deux races et n'agit pas sur le *B. dysentérique*).

En 1923, Gratia avait signalé (2) qu'un échantillon de type *Smooth* isolé par lui de la culture normale était réfractaire au principe à petites taches. C'est sur ce point que Bordet et Renaux sont en désaccord avec lui car ils n'ont jamais trouvé de représentants de ce type qui soient insensibles au principe fort.

D'autre part, Gratia signale que Bordet, dans sa note de 1922, insiste sur l'in vraisemblance de l'existence, dans le principe initial, de virus de virulences différentes. Mais il s'agit uniquement ici, bien entendu, du virus animé de d'Hérelle auquel Bordet ne croit pas. En réalité, dans cette même note, Bordet démontre précisément que l'on peut extraire du principe initial un principe dont les caractères de virulence sont différents et c'est justement ce fait qu'il considère (p. 989) comme peu favorable à la théorie du virus, lequel ne saurait vraisemblablement

(1) BORDET. Ces *Annales*, 39, 1927, p. 717.

(2) GRATIA. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 89, 1923, p. 824.

blement pas manifester des différences de virulence semblables à celles que l'on constate.

Il est naturellement exact, comme le dit Gratia (p. 308), que le mélange des deux principes constitue un agent lytique très puissant. Mais il n'est pas tout à fait exact de dire, d'une façon générale, que les microbes qui sont parvenus à résister à l'un des principes sont lysés par l'autre : le principe à petites taches qui attaque le type *R* lyse les microbes du type *S* qui ont résisté au principe faible puisque, comme Bordet l'avait vu, ces microbes appartiennent au type *R* normal. Mais les résistants au principe fort sont réfractaires au principe faible s'ils dérivent du type *R*; le contact du principe fort n'a pas modifié leur résistance originelle au principe faible (1).

Les deux principes sont-ils foncièrement différents et autonomes, ou bien ne sont-ce que des modalités distinctes d'un principe originel unique, modalités apparaissant à un moment donné, grâce sans doute à l'intervention des races microbiennes, *S*, *R*, ou type intermédiaire difficilement saisissable? On l'ignore. La composition réelle du principe initial est peut-être bien complexe et mal connue. Par définition, on ne peut isoler un principe sans le régénérer sur gélose dans des conditions assez particulières, notamment de grande dilution, tandis que, dans le bouillon, les diverses modalités du principe agissent ensemble sur la totalité complexe de la population microbienne.

Bordet, qui incline à penser que ces modalités dérivent les unes des autres, a réussi, en faisant intervenir le principe faible à forte concentration, à le rendre finalement lytique pour le type *R*. (Ces *Annales*, 39, 1925, p. 748.) Gratia dit aujourd'hui avoir tenté avec succès, en revenant de vacances, de réaliser l'adaptation de ce principe faible (à grandes taches) au type *R*. Mais il n'a pas publié cette expérience, fort analogue à celle que Bordet a décrite dans son mémoire paru il y a huit ans.

Tel est l'historique, strictement exact et impartial, de cette question.

(1) Bordet et Renaux ont donné quelques indications relatives aux microbes résistants dans leur mémoire de novembre 1932.

RECHERCHES SUR LA PRÉPARATION DU SÉRUM ANTISTREPTOCOCCIQUE

par L. COTONI, E. CÉSARI et M^{lle} N. CHAMBRIN.

Depuis 1927, date de nos dernières publications sur les streptocoques, nous n'avons pas cessé de poursuivre, parmi d'autres recherches, l'étude de l'immunisation antistreptococcique. Le fait que la plupart des échantillons de streptocoque isolés dans les infections humaines sont d'une médiocre virulence ou même dénués de virulence à l'égard de la souris et du lapin, rend extrêmement laborieuse l'étude du sujet. Pour vacciner les animaux et surtout fournir la preuve de leur état réfractaire, il faut trouver dans la nature des échantillons exceptionnels. Lorsqu'on les possède, on a grand'peine à vacciner les animaux par les méthodes déjà connues. Il n'est pas moins difficile d'obtenir des antisérums actifs et de prouver leur activité, cela d'autant plus que la souris semble être un réactif infidèle du pouvoir antiinfectieux du sérum antistreptococcique. L'étude de l'agglutination est malaisée dans une espèce microbienne dont les cultures s'agglutinent spontanément, l'espèce est morcelée en races antigènes multiples, bref, beaucoup d'obstacles encombrent la route qui conduirait au but, l'immunisation antistreptococcique.

A la suite de nos recherches anciennes, nous avons isolé un grand nombre d'échantillons de streptocoques; certains nous ont été fournis aimablement par nos collègues Lévy-Brühl, Reilly, Truche et Urbain. Nous avons plus spécialement étudié 93 échantillons humains et animaux, provenant des affections les plus diverses. Citons, parmi les infections humaines, les suivantes : suppurations ganglionnaires, péritonéales, pleurales, méningées, articulaires, cutanées, auriculaires, mastoïdiennes, sinusiennes, infections puerpérales, endocardite, septicémies diverses, scarlatine, érysipèle, angines, lésions pulmonaires, artérite, pemphigus. D'autres échantillons, animaux, proviennent d'espèces telles que : cheval (infection

gourmeuse ou autre), vache (mammite), cobaye, porc, mouton, singe, chien, poule, perruche, bouvreuil. Rien de spécial à ajouter à l'un de nos mémoires antérieurs (1) au sujet des caractères de ces échantillons. Nous insisterons seulement à nouveau sur l'absence habituelle de pouvoir pathogène accusé des streptocoques humains pour le lapin et la souris. Sur 60 échantillons, hémolytiques ou non, étudiés chez le lapin (dont 39 humains et 21 animaux), 8 seulement font périr le lapin, la dose intraveineuse mortelle de culture variant entre 10^{-3} et 10^{-6} cent. cube; sur ces 8 échantillons virulents, 5 proviennent de chevaux gourmeux, 3 de la poule, *aucun n'est d'origine humaine*. Quant à la virulence pour la souris, elle est peu répandue. Sur 66 échantillons (48 humains et 18 animaux), 19 seulement tuent la souris à des doses plus faibles que 10^{-1} cent. cube, la dose mortelle atteignant rarement 10^{-5} cent. cube; sur ces 19 échantillons, 6 proviennent des animaux (cheval, cobaye, poule).

Cette rareté du pouvoir pathogène des streptocoques vis-à-vis des animaux d'expérience usuels nous a conduits à étudier la virulence de certains échantillons chez les *oiseaux*, et en particulier chez le calfat (*Padda oryzivora*) et les oiseaux communément appelés jeunes chanteurs, appartenant aux Plocéidés. Quelques recherches ont été faites chez le pigeon. Aucun des 5 échantillons humains n'a tué les oiseaux; par contre, certains streptocoques, d'origine aviaire ou équine (gourme), inoculés dans les muscles, peuvent se montrer virulents et septicémiques chez les oiseaux, même à très faibles doses. Ceux-ci succombent généralement d'une façon rapide et l'autopsie montre la présence en abondance de streptocoques dans le sang et les viscères; les corps microbiens sont parfois entourés dans le sang d'une capsule aisément colorable en rose par la fuchsine. Le tableau ci-joint résume quelques titrages faits comparativement chez les rongeurs et les oiseaux. Les streptocoques virulents pour les oiseaux demeurent assez rares, et la virulence pour la souris ou même le lapin n'implique pas nécessairement, chez le même échantillon, la virulence pour les oiseaux.

(1) Ces *Annales*, 41, 1927, p. 919 et 1270.

ÉCHANTILLONS	ORIGINE	POUVOIR hémolytique	DOSE MORTELLE DE CULTURE LIQUIDE, EXPRIMÉE EN FRACTION DE CENTIMÈTRE CUBE		
			Souris	Lapin	Oiseaux
Pion	Aviaire (poule).	+	10 - 3 sous la peau.	10 - 2 sous la peau.	Calfat, 10 - 6 dans le muscle, mort en 2 jours 1/2. Pigeon, 10 - 5 dans le muscle, mort en 1 jour 1/2.
Maurice . .	Aviaire (poule).	+	10 - 4 sous la peau, mort inconstante	10 - 5 mort en 1 jour 1/2.	Jeune chanteur, 10 - 4 dans le muscle, mort en 1 jour 1/2. Pigeon, 10 - 1 dans la veine, survie.
Lebigre. . .	Aviaire (poule).	+	10 - 4 au moins sous la peau.	10 - 4 au moins sous la peau.	Jeune chanteur, 10 - 4 au moins dans le muscle, mort en 6 jours.
Pons	Aviaire (poule).	-	10 - 4 sous la peau, survie.	10 - 1 dans la veine, survie.	Jeune chanteur, 10 - 1 dans le muscle, survie.
Caen	Cheval (gourme).	+	10 - 5 sous la peau.	10 - 1 dans la veine.	Calfat, 10 - 6 dans le muscle, mort en 2 jours 1/2.
Mâcon I . .	Cheval (gourme).	+	10 - 5 dans le péritoine.	10 - 4 dans la veine.	Calfat, 10 - 3 dans le muscle, survie.
Saint-Cyr. .	Cheval (gourme).	+	10 - 3 sous la peau.		Calfat, avirulent.
41.	Humaine (septicémie puerpérale).	+	10 - 3 sous la peau.	10 - 1 dans la veine, survie.	Pigeon, 10 - 1 dans la veine, survie.
Desch . . .	Humaine (olite).	+	10 - 3 dans le péritoine.	Avirulent.	Pigeon, avirulent.
Lopez . . .	Humaine (olite).	+	10 - 3 sous la peau, survie.		Jeune chanteur, avirulent.
Widal . . .	Humaine (méningite).	-	10 - 3 sous la peau, survie.	1/2 sous la peau, survie.	Jeune chanteur, avirulent.

Immunisation active du lapin.

Notre objectif principal demeurant toujours la préparation de sérums antistreptococciques thérapeutiques, nous nous sommes attachés d'abord à l'étude de l'*immunisation active du lapin*. Notre mémoire déjà cité concluait à la difficulté de vacciner le lapin par les procédés en usage pour d'autres espèces microbiennes. L'emploi d'échantillons de virulence très diverse, chez les uns nulle pour la souris et le lapin, chez un autre très accusée pour le lapin (dose mortelle : 10^{-9} cent. cube de culture sous la peau) n'avaient fourni que des succès irréguliers. Les antigènes avaient été administrés par voie veineuse ou musculaire sous des formes variées : cultures vivantes, émulsions microbiennes en eau physiologique chauffées une demi-heure à 55° , corps microbiens tués par l'exposition à des vapeurs antiseptiques ou à la température de 45° , maintenue vingt-quatre heures, etc. Cependant, dès 1926, nous obtenions, avec Netter et André (1), des résultats meilleurs par l'emploi de cultures additionnées de ricinoléate de sodium. Nous inspirant d'expériences anciennes de Larson et ses collaborateurs sur les toxines et les espèces microbiennes, traitées par ce savon, nous étions parvenus à vacciner le lapin contre un échantillon aviaire de streptocoque virulent pour cette espèce (dose mortelle, sous la peau, 10^{-3} cent. cube); les lapins, ainsi vaccinés, supportaient le douzième jour, après une seule injection sous-cutanée de culture ricinoléatée, l'inoculation, également sous la peau, de 100 doses mortelles de culture virulente. Mais un gros obstacle demeurait : le sérum des lapins traités depuis longtemps dans ces conditions diverses restait dénué de toute propriété préventive dans l'infection expérimentale de la souris.

Cependant ces résultats *positifs*, quoique isolés, offraient un contraste trop frappant avec nos innombrables résultats *négatifs* antérieurs et ceux des auteurs en général, pour que nous ne désirions pas poursuivre ces recherches. Ce sont elles que nous allons exposer ici maintenant. Elles n'ont été possibles

(1) C. R. Soc. Biol., 96, 1927, p. 184.

que grâce à l'amabilité de notre collègue André, pharmacien de la Salpêtrière ; il a bien voulu préparer pour nous durant plusieurs années du ricinoléate de sodium, et nous sommes heureux de le remercier ici de sa précieuse collaboration.

Le pouvoir bactéricide du ricinoléate de sodium varie vis-à-vis des différents échantillons de streptocoque. Kozlowski (1), qui a fait une étude spéciale de cette question, trouve particulièrement sensibles des échantillons isolés de l'érysipèle, de la rougeole, de la scarlatine. Pour divers échantillons, humains et animaux, étudiés par nous, les cultures de seize heures à 35° en bouillon Martin glucosé à 2 p. 1.000 ont été additionnées de ricinoléate à des taux variables, placées sept heures à 35°, puis repiquées en milieu neuf. Dans ces conditions expérimentales, le taux de 1/10.000 se montre en général bactéricide, mais il faut atteindre 1/5.000 pour tuer certains streptocoques et pour d'autres il suffit de 1/50.000. Nous n'avons pas pu établir de relation entre la sensibilité d'un échantillon à l'action bactéricide du ricinoléate et son pouvoir pathogène pour la souris ou l'âge de sa conservation *in vitro*, hors de l'organisme.

Le plus souvent, l'antigène employé pour l'immunisation active du lapin a consisté en cultures dans le milieu T, âgées de huit heures à vingt-quatre heures, seize heures, en général, à 35°, mises en contact avec un égal volume de solution au millième de ricinoléate de sodium dans l'eau salée à 1 p. 100. La concentration du savon dans le mélange injecté atteignait ainsi 1 p. 2.000. Nos premiers essais de vaccination par *voie sous-cutanée* ne fournirent que des résultats inconstants : avec l'échantillon Maurice, d'origine aviaire, tuant le lapin sous la peau à 10⁻⁵ cent. cube, 6 lapins sur 19, traités par une seule injection, résistèrent seuls à l'épreuve de l'injection sous-cutanée de 100 doses mortelles. Nous trouvâmes qu'on pouvait obtenir des résultats meilleurs en utilisant *la voie veineuse*. Après de nombreux tâtonnements, nous fûmes amenés à combiner l'emploi de la voie veineuse et celui des doses *faibles et répétées* d'antigènes administrées pendant plusieurs jours de suite ; les résultats s'améliorèrent ; quant à

(1) *Journ. of Immunol.*, 16, 1928, p. 203.

l'emploi d'une dose massive unique, il est à déconseiller. En général, nous injectons à chaque lapin dans la veine, quatre jours de suite, 1/2 cent. cube de mélange de la culture et de la solution ricinoléatée, une série de quatre injections étant séparée de la série suivante par un repos de dix jours. La vaccination est le plus souvent bien tolérée et le poids des animaux augmente après le traitement. L'épreuve est faite dix jours après la dernière injection, par inoculation au lapin de culture virulente sous la peau ou dans la veine.

Les résultats obtenus varient suivant l'échantillon de streptocoque utilisé comme vaccin. Avec le streptocoque aviaire Maurice, déjà cité, 2 lapins sur 3 ont résisté à l'injection sous-cutanée de 100 doses mortelles. Avec l'échantillon aviaire Pion, tuant le lapin sous la peau à 10^{-4} cent. cube et dans la veine à 10^{-6} cent. cube, sur 16 lapins traités, on compte 11 vaccinés avec succès, c'est-à-dire les 2/3 environ; dès le quinzième jour après le début de la vaccination, certains animaux pouvaient supporter l'injection sous-cutanée de 10 doses mortelles de culture. Mentionnons 4 lapins qui, après un traitement de trois mois, résistaient à l'injection intra-veineuse de 1.000 et 10.000 doses mortelles, 2 d'entre eux ayant reçu chacun, en 3 séries d'injections, un total de 38 cent. cubes de la culture ricinoléatée. Les autres lapins vaccinés avec succès ont supporté impunément 100 doses mortelles. Quant à ceux qui ont succombé à l'épreuve virulente, c'est quelquefois avec un retard d'une dizaine de jours sur les témoins-culture; l'examen microscopique du sang et des viscères peut demeurer négatif, l'hémolyse du sang faire défaut, et, seul, l'ensemencement de ce dernier déceler le streptocoque.

Les résultats se montrent nettement supérieurs avec l'emploi de certains échantillons gourmeux. Le streptocoque Mâcon I, qui tue le lapin dans la veine à 10^{-6} cent. cube, vaccine 6 lapins sur 6, l'épreuve étant faite quatre semaines après le début du traitement avec 10 à 1.000 doses mortelles. Le streptocoque Mâcon II moins virulent, qui ne tue le lapin qu'à 10^{-2} cent. cube dans la veine, vaccine également 6 lapins sur 6, dans le même délai, contre 10.000 doses mortelles de l'échantillon précédent. Il semble donc que dans cette vaccination

comme dans d'autres, il y ait lieu d'attacher une grande importance au choix de l'échantillon employé comme vaccin.

Le choix de l'espèce animale utilisée pour étudier la vaccination n'est d'ailleurs pas moins important. En effet, quoique Kozłowski (1) ait obtenu certains résultats favorables dans la vaccination de la *souris* par les antigènes ricinoléatés, nos propres résultats, dans des conditions différentes d'expérience mais intentionnellement très variées, ont toujours été négatifs, que l'antigène fût administré sous la peau, dans la veine, ou dans les muscles. Même échec chez le *calfat* et le *pigeon*.

Quelque favorables que se montrent les résultats de la vaccination du lapin au moyen des cultures ricinoléatées, on ne saurait évidemment conclure de là que l'emploi d'un savon est indispensable pour obtenir l'immunité contre le streptocoque. Nous avons pu vacciner également le lapin par un procédé tout différent. Un extrait streptococcique était préparé d'après la technique suivante, dérivée de celle de Besredka (endotoxines microbiennes) et de celle de Teissier, Reilly et Rivalier (2) [antigène extrait du bacille de Ducrey].

Une culture en macération de panse glucosée à 2 p. 1.000 de l'échantillon aviaire Pion est centrifugée, le culot additionné de chlorure de sodium anhydre (1 gramme par litre de culture), soigneusement broyé, desséché sous le vide sulfurique. La poudre obtenue est mise en contact avec de l'eau distillée à la glacière une nuit (1 centigramme de poudre pour 1 cent. cube d'eau distillée); le lendemain, on centrifuge et on emploie comme antigène le liquide clair surnageant.

En traitant chaque semaine les lapins par une injection dans la veine, on parvient à vacciner le lapin. Par exemple, sur 8 lapins traités par un nombre variable d'injections, nous voyons 5 lapins survivre à l'injection sous-cutanée de 100 doses mortelles de culture virulente; ces animaux avaient reçu quatre à sept injections vaccinales, c'est-à-dire des volumes de centrifugat correspondant à la macération de 12 à 90 milligrammes de poudre chlorurée.

(1) *Journ. of Immunol.*, 15, 1928, p. 115.

(2) *Journ. Phys. et Path. Gén.*, 25, 1927, p. 268.

Antisérums obtenus chez le lapin.

Quelles sont les *propriétés du sérum des lapins vaccinés* par le procédé au ricinoléate? Dans notre mémoire précédent, les lapins traités *sous la peau* offraient des sérums dénués le plus souvent de propriétés préventives dans les épreuves d'immunisation passive faites chez le lapin et la souris. Nous avons repris ces expériences, en les modifiant quelquefois, avec l'échantillon aviaire Pion. Des lapins, pesant environ 2 à 3 kilogrammes, recevaient *dans les veines* des injections de cultures ricinoléatées suivant le protocole indiqué pour l'étude de la vaccination active. Il faut, en général, arriver à des doses égales ou supérieures à 5 cent. cubes de culture pour que le sérum des lapins présente des propriétés préventives chez la souris, et encore demeurent-elles très faibles. Les résultats s'améliorent quand on fait succéder aux trois séries d'injections de quatre jours du type précédent des injections d'antigène à *doses plus fortes*. On voit alors tel lapin ayant reçu un total de 19 c. c. 1/2 de culture (plus la solution de savon) fournir un sérum, dont 1/2 cent. cube injecté la veille sous la peau de la souris protège contre l'injection intrapéritonéale faite le lendemain de 1.000 doses mortelles de culture; 10 cent. cubes du même sérum protègent le lapin contre l'injection intraveineuse de 100 doses mortelles. Tel autre lapin, ayant reçu en tout 5 cent. cubes de culture, possède un sérum dont 1/2 cent. cube injecté la veille dans le péritoine de la souris protège contre 100 doses mortelles de culture injectée le lendemain, par la même voie.

Antisérums obtenus chez le cheval.

Ces résultats, obtenus dans l'étude de l'immunité passive du lapin, étaient malgré tout inconstants et nous aurions pu hésiter à étendre nos recherches aux *chevaux*. Bien nous prit cependant de persister, puisqu'elles se sont montrées satisfaisantes, réalisant un *progrès incontestable sur les résultats jusqu'ici obtenus*.

De nombreux échantillons de streptocoque ont été employés

pour le traitement des chevaux, chaque animal recevant en principe toujours le même échantillon. Les streptocoques, tous pathogènes, utilisés, provenaient des infections les plus diverses. Parmi eux, les uns étaient d'origine animale, isolés de la poule et du cheval (gourme), et tuant le lapin à faibles doses (10^{-6} cent. cube intraveineux) par septicémie, les autres avaient une origine humaine (érysipèle, otite, scarlatine, broncho-pneumonie, endocardite, infection puerpérale, et étaient avirulents pour le lapin, peu ou pas virulents pour la souris. Tous ont été administrés par la voie veineuse, mais la forme de l'antigène a varié au cours de nos expériences. L'emploi des corps microbiens tués par le chauffage à 45° à sec, ou par l'alcool-éther, a été abandonné, des tentatives nombreuses chez le lapin et le cheval nous ayant montré que les streptocoques ainsi traités sont médiocrement capables d'engendrer des anticorps protecteurs *in vivo*. Nous avons essayé chez les chevaux, comme chez le lapin, l'emploi de l'antigène au chlorure de sodium déjà signalé. Les résultats ne sont pas négligeables, mais l'emploi des cultures ricinoléatées nous a paru préférable, les injections étant faites quatre jours de suite et réparties suivant des rythmes variés. Les saignées ont toujours lieu le dixième jour après la dernière injection. Les chevaux peuvent supporter pendant plusieurs années l'administration des antigènes ricinoléatés; il est juste de dire que certains échantillons de streptocoque sont plus difficiles à faire tolérer que d'autres.

Le pouvoir *antiinfectieux* des sérums ne peut, évidemment, être étudié que vis-à-vis des échantillons de streptocoque capables de tuer les animaux. C'est dire que cette étude est limitée à des échantillons somme toute exceptionnels. Ici s'ajoute, en outre, une difficulté particulière au streptocoque. Le choix de l'*espèce animale* utilisée pour le titrage des sérums ne paraît pas négligeable. Nous avons longtemps expérimenté avec la souris blanche, qui convient au titrage des sérums anti-pneumococciques. Devant des insuccès de plusieurs années et après comparaison avec le lapin, nous avons plus ou moins abandonné l'emploi de la souris. Ce n'est pas qu'on ne rencontre quelquefois des échantillons de sérum doués de pouvoir préventif chez la souris. Mais on observe ce résultat contradictoire : un sérum manifestement actif chez le lapin peut se montrer

médiocre ou inactif chez la souris. D'autre part, le même échantillon de sérum titré deux fois de suite peut fournir des résultats divergents. De nombreuses variantes de technique ont été étudiées pour le titrage : mélange de culture et de sérum injecté dans le péritoine ou sous la peau, comprenant des doses fixes ou variables de sérum ; injections sous la peau de sérum, puis, le lendemain, de la culture ; le procédé le moins infidèle nous a paru consister dans l'injection de sérum sous la peau la veille et de culture dans le péritoine le lendemain. Notons que nous avons vu parfois l'injection intrapéritonéale de sérum équin normal, pris comme témoin, se montrer capable de protéger la souris contre l'inoculation péritonéale de 1.000 doses mortelles, et la survie des animaux se produire avec des irrégularités déconcertantes. Ces difficultés sont d'autant plus regrettables que la souris, plus sensible aux streptocoques que le lapin, pourrait servir au titrage d'un plus grand nombre de sérums. Pareillement, chez le *calfat* et le *pigeon*, des sérums actifs pour le lapin sont demeurés impuissants à protéger ces deux espèces animales. Avec le lapin, par contre, les résultats sont d'une lecture beaucoup plus facile, et se montrent plus réguliers, plus logiques.

Nous nous sommes donc arrêtés à la technique suivante, que l'expérience nous a révélé la meilleure. La veille, 5 à 10 cent. cubes d'antisérum sont injectés sous la peau du lapin, qui reçoit le lendemain, dans la veine, 100 à 1.000 doses mortelles de culture virulente en bouillon Martin-sérum équin (1/10), âgée de seize heures à 35°. Des lapins témoins sont traités par le sérum équin normal, d'autres par la culture seule, à doses variées. Les lapins inoculés avec l'antisérum peuvent résister ou succomber avec les témoins ou plusieurs jours après ; en ce cas, l'examen microscopique des organes est négatif, seul est positif l'ensemencement du sang.

Étudiés par cette méthode, *certaines sérums antistreptococciques* à la dose de 5, parfois 2 cent. cubes, *peuvent protéger les lapins contre l'injection intraveineuse de 100 à 1.000 doses mortelles de culture*. Par exemple, les lapins témoins meurent après avoir reçu 10^{-6} cent. cube de culture, les lapins-sérum résistent à 10^{-2} . Il faut noter que, parmi les échantillons utilisés comme antigènes, ce ne sont pas toujours les plus virulents pour le

lapin qui fournissent les meilleurs résultats. Le pouvoir anti-infectieux peut apparaître très tôt dans le sérum des chevaux. Nous avons vu, avec quelque surprise, certains sérums posséder cette propriété *dès le quinzième jour*, ces mêmes sérums étant, bien entendu, inactifs avant le traitement. Cette activité précoce des sérums de chevaux s'oppose à la lenteur des résultats, souvent médiocres, obtenus chez le lapin. Neufeld (1) a observé l'inverse, mais ses conditions expérimentales étaient toutes différentes. Nos résultats précoces s'opposent aussi à ceux que Marmorek (2) mettait si longtemps à obtenir. Le pouvoir anti-infectieux peut, d'ailleurs, baisser et disparaître pendant plusieurs mois puis réapparaître ; quelquefois, il cesse avant la mort du cheval. D'une façon générale, les sérums actifs s'avèrent actifs dès le début du traitement.

Non seulement le sérum est préventif, mais il peut se montrer *franchement curatif dans la septicémie streptococcique du lapin*. Qu'on en juge par la lecture des résultats suivants. On injecte dans les veines de plusieurs lapins 10^{-3} cent. cube, c'est-à-dire 1.000 doses mortelles de la culture Mâcon I, dont 10^{-6} cent. cube tue le lapin en un jour à un jour et demi, puis on traite ces lapins, toujours dans les veines, par l'injection d'un sérum préparé avec l'échantillon Mâcon II. Sur 2 lapins traités une heure après l'injection du virus, nous notons 2 *survies* ; sur 3 lapins traités deux heures après, 3 *survies* ; sur 2 lapins traités quatre heures après, 2 *survies* ; sur 2 lapins traités six heures après, 1 *survie*. Ajoutons qu'un sérum préparé avec le streptocoque Pion (appartenant à une race voisine de celle des échantillons Mâcon I et Mâcon II) a pu protéger un lapin injecté une heure plus tôt avec le streptocoque Mâcon I. Au contraire, le sérum équin normal, même administré une heure après le virus, est inefficace. Inefficace également un sérum préparé avec le streptocoque 41, d'une race différente. Nous voyons donc ici un sérum se montrer impuissant à *guérir* le lapin infecté par un streptocoque de race étrangère ; à propos de l'étude de l'immunité croisée, nous retrouverons pareil sérum impuissant à *prévenir* cette même infection.

Si nous insistons sur le pouvoir anti-infectieux de nos sérums,

(1) *Z. f. Hyg.*, 1903, 161.

(2) *Ces Annales*, 9. 1893, p. 593.

pouvoir accusé chez le lapin, c'est que nous trouvons là un gage sérieux de leur efficacité thérapeutique. Quand le pouvoir anti-infectieux d'un sérum n'a pu être démontré ou n'est pas, pour des motifs techniques, démontrable par des essais chez les animaux d'expérience, on exige avec raison que soit fournie la preuve de son efficacité dans le traitement des maladies spontanées humaines ou animales; ce serait le cas du sérum anti-streptococcique préparé par Vincent (1).

La rareté des échantillons de streptocoque tuant rapidement le lapin par septicémie nous a amenés à tenter le titrage de nos sérums par un autre procédé. Gromakowsky (2), De Lavergne, Florentin et Gousset (3) ont déjà étudié l'action des sérums sur l'érysipèle du lapin. Certains échantillons de streptocoque, inoculés sous la peau ou dans le derme du pavillon de l'oreille, sont capables, comme on sait, de provoquer chez le lapin l'apparition d'un érysipèle. Le premier signe est un érythème au point injecté, éphémère ou durable, s'étendant parfois à toute la surface de l'oreille. Puis, apparaît un œdème, d'abord localisé, qui peut envahir également l'oreille tout entière, devenue pendante. Si la mort ne succède pas à l'infection généralisée, l'œdème peut se localiser. Parfois, on ne perçoit qu'une infiltration très limitée sous forme d'une amande ou d'un pois de consistance ferme; parfois apparaît une escarre, dont la chute montre une ulcération laissant sourdre, par pression, un exsudat blanchâtre, crémeux, contenant des streptocoques. L'œdème persiste parfois pendant plusieurs semaines, s'accompagne de nécrose de l'extrémité de l'oreille et de chute de poils. Des lésions d'aspect impétigineux du nez, la conjonctivite à streptocoques, peuvent compliquer encore l'érysipèle chez certains lapins, que l'œdème de la face rend méconnaissables. En injectant 5 cent. cubes d'un antisérum dans la veine, et le lendemain la culture sous la peau de l'oreille, nous avons observé quelquefois une atténuation indiscutable des lésions, qui évoluent plus vite vers la guérison. Mais une première difficulté réside dans le fait que l'injection virulente ne provoque pas l'apparition de l'érysipèle infailli-

(1) *C. R. Acad. Sciences*, 188, 1929, p. 1318; *Bull. Acad. Méd.*, 107, n° 12, 1932.

(2) *Ces Annales*, 9, 1895, p. 621.

(3) *C. R. Soc. Biol.*, 101, 1929, p. 1193.

blement chez tous les lapins inoculés; aussi de pareilles recherches n'auraient quelque valeur que pratiquées sur un grand nombre d'animaux. Une seconde difficulté est due à ce que tous les échantillons de streptocoque, même virulents pour le lapin, et même d'origine érysipélateuse humaine, ne se montrent pas capables de produire l'érysipèle de l'oreille du lapin.

Classification sérologique des streptocoques.

Délaissant l'étude du pouvoir agglutinant de nos sérums, étude particulièrement ardue malgré l'emploi de techniques spéciales (Dochez) chez une espèce spontanément agglutinable, nous nous sommes attachés à celle de la précipitation. Deux techniques peuvent être utilisées dans ce but; elles fournissent d'ailleurs des résultats tout différents.

1° PRÉCIPITATION DES FILTRATS DE CULTURES STREPTOCOCCIQUES.

La technique est des plus simples. On ajoute à 1 cent. cube de culture en milieu T de seize heures, filtrée, 1 cent. cube de sérum. Il se produit dans les cas positifs un trouble *instantané*. On peut, plus simplement, utiliser le liquide de centrifugation de la culture, si la lecture du phénomène est faite aussitôt. Dans le cas contraire, les corps microbiens, qui ayant échappé à la centrifugation sont restés dans le liquide clair, peuvent se multiplier, et le trouble ainsi produit rendre le lendemain la lecture impossible. Nous n'avons pas étudié la précipitation *tardive* (dix heures) qu'on peut observer à 40° en mélangeant le filtrat de culture de streptocoque scarlatineux avec le sérum des chevaux ayant reçu des injections sous-cutanées de filtrat, comme l'ont fait Ramon, Martin et Laffaille (1). Les sérums des chevaux que nous traitions autrefois par les corps microbiens alcool-éther ne précipitent pas les filtrats. Les sérums des chevaux traités par les cultures ricinoléatées précipitent les filtrats de l'échantillon homologue, quelquefois seulement après plusieurs mois d'immunisation, et, une fois établi, ce pou-

(1) C. R. Acad. Sciences, 186, 1928, p. 1452.

voir précipitant ne disparaît plus. Il peut aussi s'exercer vis-à-vis des filtrats d'échantillons étrangers (1).

2° PRÉCIPITATION DES EXTRAITS MICROBIENS.

L'étude de cette précipitation nous a retenus beaucoup plus longtemps que celle de la précédente ; nous avons pu, grâce à elle, réaliser un essai de classement des divers échantillons de streptocoque rencontrés, et nous devons remercier ici M^{me} Lancefield de l'aide apportée à nos recherches. Les extraits microbiens étaient préparés suivant une technique presque identique à la sienne (2).

Préparation de l'extrait. — On centrifuge une culture de streptocoque âgée de dix-huit heures à 37° en bouillon Martin simple ($pH = 7,8$). Le culot de 1 litre de culture est émulsionné dans 9 c. c. 5 d'eau salée à 1 p. 100 ; on ajoute à l'émulsion 0 c. c. 5 de la solution normale d'HCl. Ces quantités sont choisies de manière à obtenir une concentration en HCl N/20. On plonge l'émulsion quinze minutes dans l'eau bouillante en agitant de temps en temps, on refroidit, on centrifuge, et le liquide clair est neutralisé par la solution normale de NaOH. Il se forme un précipité, on centrifuge à nouveau, et le liquide clair est utilisé comme antigène. Dans les cas où la culture est maigre, on peut réduire le volume de l'eau physiologique à 7,6 en opérant toujours avec une concentration d'HCl N/20.

Précipitation. — On mélange à 0 c. c. 4, ou 0 c. c. 3 et 0 c. c. 1 d'antigène à 0 c. c. 1 de sérum, et on complète à 0 c. c. 4 avec de l'eau physiologique. Les tubes sont agités, placés deux heures à 37°. On fait une première lecture après deux heures et une deuxième le lendemain, après séjour d'une nuit à la glacière. Dans les cas positifs, on observe un trouble plus ou moins intense, qui peut même apparaître dès le mélange de l'antigène et du sérum.

Avant de parler des races de streptocoques, indiquons les propriétés précipitantes des sérums de nos chevaux vis-à-vis des extraits streptococciques correspondants. Les résultats dépendent ici de la forme sous laquelle est administré l'antigène. Les sérums préparés au moyen des antigènes alcool-éther ne précipitent que peu ou pas. Les sérums préparés avec l'antigène NaCl peuvent précipiter dès le quinzième jour de l'immuni-

(1) Les sérums de lapins traités par les cultures ricinoléatées dans la veine précipitent tous le filtrat correspondant, et quelquefois l'extrait chloruré déjà cité. Quant aux lapins traités par cet extrait chloruré, leurs sérums le précipitent souvent, et dans certains cas rares, les cultures filtrées.

(2) *J. of Exp. Med.*, 47, 1928, p. 91.

sation, avant même de précipiter les filtrats de cultures. Quant aux sérums des chevaux traités par les antigènes ricinoléatés, c'est-à-dire le plus grand nombre de nos sérums, ils peuvent également précipiter d'une façon précoce. Rarement, nous avons constaté l'absence de ce pouvoir précipitant pendant tout le cours de l'immunisation, chez un cheval fournissant un sérum franchement actif vis-à-vis du lapin; il est vrai que des sérums doués d'indiscutables propriétés antiinfectieuses ont pu nous apparaître dénués de tout pouvoir fixateur dans l'épreuve de Bordet-Gengou. Par contre, le pouvoir précipitant peut se rencontrer chez un sérum dépourvu de propriétés antiinfectieuses. Aussi ne peut-on, semble-t-il, s'appuyer actuellement sur la constatation du pouvoir précipitant pour présumer à coup sûr de l'activité chez le lapin. Impossibilité d'autant plus regrettable que de pareils sérums antimicrobiens ne se prêtent souvent pas au titrage chez l'animal. Quant aux *sérums de malades*, nous en avons examiné trois. Le premier, prélevé au huitième jour après l'accouchement, provenait d'une femme atteinte d'infection; le deuxième avait été recueilli après deux mois chez une malade présentant une pleurésie, puis un érysipèle. Les deux échantillons de streptocoque correspondants appartenaient au même groupe; aucun des deux sérums n'a pu protéger la souris contre l'infection causée par le plus virulent des deux échantillons. Ajoutons que le sérum de la puerpérale ne précipitait pas l'extrait microbien correspondant et, pas plus que le sérum de la pleurétique, ne se montrait antihémolytique (1). Quant au troisième sérum, il avait été fourni par un homme atteint de pemphigus végétant grave; il ne précipitait pas non plus l'extrait préparé avec l'échantillon de streptocoque isolé de lésions cutanées.

Revenons maintenant à la question des *groupes de streptocoques*. Lancefield, qui a publié toute une série de recherches sur la structure chimique des streptocoques, arrive à classer les streptocoques hémolytiques en plusieurs groupes. Cette classification a été obtenue en faisant agir sur les extraits chlorhydriques microbiens, des sérums préparés *chez le lapin*

(1) Il est juste d'ajouter que, depuis ces recherches, Todd a fait connaître une technique assez compliquée permettant de déceler une antihémolysine streptococcique (*J. Exp. Med.*, 55, 1932, p. 267).

par injection de cultures chauffées, puis de cultures vivantes. Un échantillon de streptocoque engendre, en effet, un sérum qui possède la propriété de précipiter avec élection son propre extrait, et les extraits d'un certain nombre d'autres échantillons. Lancefield édifie ainsi plusieurs groupes ; ils correspondent aux groupes fondés jadis par Dochez, Avery et Lancefield (1) sur les résultats de l'agglutination et de l'immunité passive que confèrent les sérums de lapins immunisés. Agapi (2), en Roumanie, appliquant la technique de Lancefield, a étudié 38 streptocoques presque tous hémolytiques et d'origine scarlatineuse. Par l'emploi de sept sérums précipitants de lapins préparés avec sept de ces échantillons, il arrive à les répartir en quatre groupes. 38,8 p. 100 de ces streptocoques ne peuvent être classés.

Nous-mêmes, préoccupés constamment du choix d'échantillons destinés à l'immunisation des chevaux, avons depuis trois ans cherché à classer un grand nombre de streptocoques pathogènes rencontrés chez l'homme et les animaux. La technique de Lancefield nous a servi à ce classement. Nos sérums réactifs ont été préparés *chez le lapin* à l'aide de certains échantillons de streptocoque traités par le ricinoléate : notre technique a été décrite plus haut, à propos de la vaccination du lapin. Assez souvent, aux séries de quatre injections décrites, on faisait succéder quelques injections plus abondantes d'antigène, après lesquelles on saignait les animaux. Au bout d'un nombre variable de semaines de traitement, le sérum des lapins acquiert la propriété de précipiter les extraits streptococciques préparés suivant la technique de Lancefield ; cette propriété peut exister dès le vingt et unième jour, mais en général nous avons saigné les lapins entre le deuxième et le troisième mois. Les sérums de nos lapins semblent ainsi acquérir des propriétés précipitantes aussi rapidement qu'avec le procédé de Lancefield ; le traitement est en général bien toléré. Il faut signaler cependant que certains échantillons d'origine humaine (érysipèle) ou animale (gourme, mammite) n'ont pas engendré de précipitines chez les lapins utilisés. Comme le montre le tableau ci-joint, 18 échantillons de strep-

(1) *J. Exp. Med.*, t. 30, 1919, p. 179.

(2) *C. R. Soc. Biol.*, 111, n° 30, p. 212.

Echantillons utilisés
pour la préparation
des
sérum précipitants
(lapin)

Echantillons humains utilisés pour la préparation des ex

Désignation		pouvoir hémolytique	Origine																														
				37 (H) infection puerpérale	41 (H) id	Richard (H) mastoïdite	15 (H)	Claude Bernard (?) hémoculture	David (O) endocardite	Gaston (?) érysipèle	Erysipèle (H)	Desch (H) otite	Lemaire (H) pus	Septicémie (H) phlegmon	2 (H) scarlatine	Sinusite (H)	Textier (H) pyohémie	Gold (H) adénophlegmon	Pemphigus (H)	18 (H)	Beckerich (H) Infect ^{on} puerpérale	Coutlez (H) pleurésie	Vivier (H) méningite	Carles (H) pleurésie	16 (H)	Martin (H) infect ^{on} puerpérale et érysipèle	Angine (H)	Beauvy (H) arthrite	Ostéo-arthrite (H) érysipèle	Blès (H) mastoïdite	1 (H) scarlatine	5 (H) scarlatine	23 (H) mastoïdite
41	H	humaine infect ^{on} puerpérale		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	H	id		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
David	O	humaine endocardite		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	H	humaine scarlatine		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2	H	id		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
Desch	H	humaine otite		-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lancefield 43	H	humaine rougeole		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Erysipèle	H	humaine érysipèle		-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Septicémie	H	humaine phlegmon		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Angine	H	humaine angine		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Jaquet	O	humaine endocardite		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Williams	H	humaine scarlatine		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mâcon I	H	équine gourme		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S ^t Cyr	H	id		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pion	H	aviaire poule		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lebégère	H	id		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mammite	O	vache mammite		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vauvillard	O	id		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

H = hémolytique

O = non hémolytique

? = Pouvoir hémolytique indéterminé

tocoques, hémolytiques ou non, ont été employés chez le lapin pour préparer des sérums précipitants, qui ont été appliqués à l'étude des streptocoques correspondants et de beaucoup d'autres. Les 18 échantillons choisis comme antigènes ont été isolés en France, d'infections humaines ou animales; seuls les échantillons 43 et Williams sont d'origine américaine. Les échantillons Septicémie et Angine ont été isolés à Madrid par le Dr Jimenez. Ne figurent pas dans ce tableau certains sérums, peu nombreux, auxquels il a été fait allusion, ne précipitant pas leurs propres extraits microbiens. Parmi les sérums étudiés, certains ne précipitent d'ailleurs exclusivement que l'extrait microbien correspondant; tels sont les sérums préparés avec les streptocoques Septicémie (phlegmon), David (endocardite), Williams (scarlatine), Vaugirard (mammitte de la vache), Mammitte (origine analogue). La plupart des sérums précipitent certains extraits seulement, d'une façon plus ou moins intense.

En choisissant comme réactifs certains sérums dont le domaine précipitant est particulièrement étendu, on arrive à isoler un certain nombre de *groupes*.

Un *premier groupe* (Mâcon I, Mâcon II, Suippes 1485, Suippes 1627, Saint-Cyr, Caen, Guingamp, Singe, Gadiou) et le sous-groupe voisin (Pion, Lebigre) comprennent la plupart de nos échantillons animaux et en particulier équins isolés dans la gourme.

Un *deuxième groupe* (Erysipèle) et le sous-groupe voisin (Desch) renferment le plus grand nombre de nos streptocoques humains : Lemaire, Septicémie, 2, Sinusite, Texier, Gold, Pemphigus, 18, Beckérich, Coutez, Vivier, Carles, 16, Martin, Richard, Angine, Beauvy, Ostéoarthrite, Blés, 1, 5, 23, Colon.

Un *troisième groupe* (37) contient les échantillons 41, Richard, 15, Claude Bernard, Gold, Gaston.

Un *quatrième groupe* rassemble, autour de l'échantillon américain Lancefield, les échantillons Merklen, Interne, Lambert, de Sèze.

Un *cinquième groupe* ne comprend que deux échantillons, d'ailleurs non hémolytiques, Boutillier et Jaquet.

Ainsi 48 streptocoques ont pu être classés en cinq groupes. Un simple regard jeté sur notre tableau montre aussitôt

qu'aucun groupe — excepté le premier — ne « ramasse » tous les streptocoques isolés dans une affection définie, telle que endocardite, érysipèle, infection puerpérale, otite, scarlatine. Dès 1919, Dochez, Avery et Lancefield (1) arrivaient à une conclusion analogue par l'étude de leurs groupes agglutinants. Sacquépée et Fricker (2) inclinent vers cette opinion. Seul, le premier groupe contient *exclusivement* des streptocoques *animaux*, certains aviaires différant un peu des équins gourmeux par leurs caractères de précipitation. Brocq-Rousseau, Forgeot et Urbain (3) avec la réaction de fixation, Urbain, Carpentier et Chaillot (4) avec l'agglutination, arrivent pareillement à séparer les streptocoques gourmeux des autres streptocoques.

Est-il besoin d'ajouter que notre classification est toute provisoire, d'ailleurs incomplète, d'autres groupes étant susceptibles de surgir après des examens ultérieurs? Certains échantillons forment, chacun pour lui, un groupe spécial sans relation avec les autres, et, en outre, nous trouvons dans notre tableau 21 échantillons sur 73 dont les extraits sont rebelles à toute précipitation au moyen des sérums réactifs. Dochez, Avery et Lancefield signalent déjà 32 p. 100 des streptocoques hémolytiques étudiés par eux comme inagglutinables par leurs sérums. Sédallian (5) qui a fait une étude importante d'un grand nombre d'échantillons, isolé plusieurs groupes et préparé des sérums thérapeutiques correspondants, est parvenu à classer 87 streptocoques hémolytiques en six groupes par la méthode de la saturation des agglutinines. Mais il trouve 35,5 p. 100 des streptocoques hémolytiques impossibles à classer. Remarquons que notre collection se compose de streptocoques hémolytiques et non hémolytiques, d'origine certainement plus *disparate*, humaine ou animale, que les collections précédentes. Il est à noter que les extraits de nos streptocoques non hémolytiques sont impossibles à précipiter par les sérums préparés avec des streptocoques hémolysants ou ne sont précipitables que par le sérum correspondant. Pour les

(1) *J. Exp. Med.*, *loc. cit.*

(2) *C. R. Soc. Biol.*, **104**, 1930, p. 1215.

(3) *Ces Annales*, **36**, 1922, p. 646.

(4) *C. R. Soc. Biol.*, **102**, 1929, p. 736.

(5) P. SÉDALLIAN. *Etudes sur les streptocoques hémolytiques pathogènes chez l'homme*. Lyon, 1925.

échantillons aberrants, la plupart ont été étudiés peu après leur isolement, on ne saurait donc admettre que leurs propriétés aient subi quelque changement par suite d'une longue conservation dans les milieux de culture. Remarquons enfin la parenté qui relie aux streptocoques français le streptocoque Lancefield 43 américain et les deux streptocoques espagnols.

Nous noterons encore, en analysant le tableau, que certains échantillons fournissent des extraits précipitables par des sérums réactifs de groupes différents. Tel est le cas, parmi d'autres, de l'extrait Gold sensible aux sérums 2, Desch, Erysipèle, d'une part, et, d'autre part, aux sérums 37 et 41 préparés eux-mêmes avec des streptocoques d'un groupe différent. On serait là en présence de streptocoques à *antigènes complexes*. C'est la notion à laquelle aboutissent déjà les recherches de Dochez, Avery et Lancefield (1919) sur l'agglutination, puis de Lancefield (1928) sur la précipitation. Dès 1925, Sédallian note l'existence de streptocoques à antigènes complexes, l'antisérum correspondant à un échantillon n'étant saturé que par ce dernier. Nos recherches confirment donc les travaux de ces auteurs. Ajoutons que Durand et Giraud (4), ensemencant par piqûre profonde divers échantillons de streptocoques dans une gélose additionnée de fécule ou d'amidon (0,5 à 1 p. 100), ont rencontré un certain nombre de germes producteurs de pigment jaune brique. Sédallian les classe dans ses groupes n^{os} 5 et 6. L'un d'eux, échantillon Bretonnier, qu'il nous a aimablement remis, d'isolement ancien, n'entre dans aucun de nos groupes. D'ailleurs, sur 52 échantillons de streptocoques dont 16 animaux, aucun ne s'est montré chromogène dans les conditions indiquées; cette variété de streptocoques paraît donc exceptionnelle actuellement.

Notre classification, toute imparfaite qu'elle est, nous a servi non seulement à confirmer la notion de races, mais à choisir un certain nombre de streptocoques de propriétés antigènes différentes pour l'immunisation des chevaux. Elle permet aussi, en présence d'un échantillon isolé chez un malade, de savoir quel sérum serait particulièrement indiqué pour le traitement. Mais, dira-t-on, existe-t-il, calqués sur ces groupes

(4) *Annales Institut Pasteur de Tunis*, 1923.

de précipitation, des groupes d'immunité? Autrement dit, s'agit-il des mêmes groupes? C'est l'opinion des auteurs précédents. En fait, les réponses à cette question ne sont pas nombreuses. Comme les échantillons streptococciques tuant les animaux à faibles doses sont rares, il est souvent impossible de réaliser des expériences d'immunité croisée. Voici quelques résultats obtenus par nous.

En ce qui concerne l'*immunité active*, nous avons pu, à l'intérieur de notre premier groupe, vacciner avec un échantillon contre plusieurs autres. Par exemple, la souche Mâcon I, d'origine gourmeuse, vaccine le lapin contre 1.000 doses mortelles de sa propre culture, et contre 1.000 doses mortelles de l'échantillon Caen, également d'origine gourmeuse; une fois sur deux, elle a vacciné contre 100 doses mortelles de la souche Pion, streptocoque aviaire, appartenant à un sous-groupe voisin par ses réactions précipitantes. Pareillement l'échantillon gourmeux Mâcon II (premier groupe) vaccine contre 10.000 doses mortelles de l'échantillon Mâcon I (premier groupe) et un lapin sur deux contre 1.000 doses mortelles de la souche Pion (sous-groupe voisin). Mais remarquons que ni la souche Mâcon I ni la souche Pion ne vaccinent le lapin contre l'échantillon aviaire Maurice, qui ne rentre dans aucun de nos groupes; toutefois, l'échantillon Mâcon II a pu vacciner un lapin sur deux contre 1.000 doses mortelles de la souche Maurice. Y aurait-il, d'après ce dernier exemple, à l'intérieur même d'un groupe donné, certains échantillons doués d'un pouvoir antigène particulièrement vaste? La solution de ce problème appellerait un complément de recherches. Si l'on passe maintenant à l'*immunité passive*, nous voyons les sérums équins, titrés chez le lapin, exercer exclusivement leur action sur les échantillons appartenant au même groupe que l'échantillon qui leur correspond. Par exemple, les sérums Mâcon II (premier groupe) protègent le lapin contre l'échantillon Mâcon I (premier groupe), mais les sérums Gold (deuxième groupe), 2 (deuxième groupe), 41 (troisième groupe) — impossibles, il faut l'ajouter, à titrer sur les trois streptocoques correspondants — sont incapables de protéger les lapins contre l'échantillon Mâcon I. Il nous est même arrivé de voir un sérum actif contre son propre échantillon de streptocoque et inactif sur un deuxième

échantillon appartenant au même groupe : c'est dire les difficultés qu'on peut rencontrer en matière de sérothérapie anti-streptococcique.

Conclusions.

Nous arrêterons ici l'exposé de nos résultats. Qu'en devons-nous conclure à l'heure actuelle, et si cette étude peut servir à « faire le point » comment le ferons-nous ? On arrive à vacciner le lapin contre le streptocoque et pour les échantillons de streptocoque virulent, les seuls capables de fournir la preuve de leur pouvoir vaccinant, les antigènes ricinoléatés nous ont fourni des résultats franchement supérieurs à tous les autres antigènes employés. Chez le cheval, ces mêmes échantillons virulents pour le lapin ont engendré des antisérums possédant *un pouvoir préventif et curatif absolument incontestable* sur l'infection du lapin. Peut-on aller plus loin ? Peut-on obtenir des sérums actifs, en partant d'échantillons pathogènes chez l'homme, mais peu ou pas virulents pour les animaux d'expériences, c'est-à-dire en partant de la plupart des échantillons de streptocoque ? Nous nous appliquons depuis longtemps à résoudre ce problème. La difficulté consiste maintenant à fournir la preuve que ces sérums sont doués d'activité. Comme le titrage chez les animaux est impossible, force est d'attendre la réponse que fournira leur essai dans le traitement des infections naturelles, humaines ou animales, dues aux échantillons correspondants. Les résultats de la vaccination active du lapin nous font craindre qu'un antisérum soit médiocrement actif, lorsqu'il exerce son action sur une infection due à un streptocoque d'une race différente ; mais une analyse plus approfondie des propriétés antigènes de divers échantillons appartenant au même groupe s'impose avant qu'on puisse être fixé.

« Les streptocoques, sous les formes employées jusqu'ici, morts ou vivants, écrivions-nous en 1927, semblent se comporter comme des germes dépourvus pour ainsi dire de facultés antigènes, tout au moins en ce qui regarde la formation d'anticorps protecteurs... Malgré les recherches d'expérimentateurs si nombreux, on serait embarrassé de trouver

actuellement dans le monde entier un sérum protégeant à *coup sûr* un animal contre une inoculation virulente. » Nous ne souscrivons plus à ces propositions et nous pouvons affirmer que nous possédons aujourd'hui un sérum actif contre l'infection expérimentale du lapin.

SPÉCIFICITÉ DE LA RÉACTION ALLERGIQUE COMME PROCÉDÉ DE DIAGNOSTIC DE LA MÉLITOCOCCIE OVINE (1),

par le Dr Ch. DUBOIS,
Directeur des Services vétérinaires du Gard.

Dans une précédente publication, j'ai montré, en collaboration avec le Dr Sollier (2), que l'injection dans le derme du pli caudal d'une émulsion de *Br. abortus* P. tués provoquait une réaction allergique de caractère spécifique chez les ovins et caprins infectés par *Brucellæ melitensis* ou porteurs de ces germes.

L'objet du présent mémoire est de fournir des précisions complémentaires sur les caractères de cette réaction et, surtout, d'apporter des preuves nouvelles de sa spécificité.

Voici le détail des différentes questions qui seront successivement développées :

CHAPITRE I. — *Résultats comparatifs de la réaction allergique provoquée par l'injection, soit de Br. abortus P. tués, soit de mélitine, chez les ovins atteints de mélitococcie expérimentale ou naturelle.*

CHAPITRE II. — *Expériences de contrôle signalant les résultats observés :*

1° *Chez des ovins atteints de mélitococcie naturelle soumis à l'intra-dermo-réaction avec une émulsion de B. typhiques :*

2° *Chez des ovins indemnes, cliniquement et sérologiquement, de mélitococcie, soumis à l'intra-dermo-réaction effectuée avec une émulsion de Br. abortus tués ;*

(1) Ch. DUBOIS. Comptes rendus de l'Académie des Sciences, 195 p. 834, séance du 7 novembre 1932.

(2) Ch. DUBOIS et N. SOLLIER. Diagnostic expérimental de la mélitococcie ovine et caprine par la recherche des réactions d'allergie. Comptes rendus de l'Académie des Sciences, 195, p. 722, séance du 24 octobre 1932.

3° Chez des ovins sains, en des régions indemnes de *mélitococcie*, soumis à l'intra-dermo-réaction pratiquée à l'aide de l'émulsion de *Br. abortus tués*.

4° Chez des ovins sains soumis à des injections successives avec l'antigène précité.

CHAPITRE III. — 1° Principaux caractères de la réaction allergique.

2° Preuves de sa spécificité.

CONCLUSIONS.

Technique suivie au cours de l'expérimentation.

Dans toutes les expériences précitées, la technique ci-après indiquée a été suivie. L'inoculation de l'antigène, quel qu'il soit, a été opérée dans le *derme* et vers le tiers supérieur de l'un des plis de la queue, à la dose de 1/3 de centicube.

Les antigènes suivants ont été employés :

1° *Mélitine* : Celle-ci a été préparée suivant la technique de Burnet et conservée en ampoules scellées au frigorigène. Elle a été utilisée quelques jours ou deux ou trois semaines au maximum après sa préparation.

2° « *Br. abortus* » *P. tués* (1) : Le produit de raclage de la surface d'une culture de trois jours sur gélose de *Br. abortus* est émulsionné dans de l'eau stérile, salée à 8,5/1.000, de façon à obtenir une richesse microbienne de 2 milliards de germes par centicube. On chauffe pendant une heure à 70° et on répartit en ampoules scellées que l'on chauffe encore à 70° pendant une heure. Les ampoules sont conservées à la glacière.

3° *B. typhiques* : La suspension de *B. typhiques* est préparée avec une culture sur gélose âgée de vingt-quatre heures, suivant la technique suivie pour la préparation de l'émulsion de *Br. abortus*. Comme cette dernière, elle renferme 2 milliards de germes par centicube.

(1) Cette souche provient de l'Institut Lister.

CHAPITRE PREMIER

Résultats comparatifs de la réaction allergique
provoquée par l'injection, soit de « Br. abortus » tués,
soit de mélitine, chez des ovins atteints
de mélitococcie expérimentale ou naturelle

I. — MÉLITOCOCCIE EXPÉRIMENTALE.

Les mêmes expériences, ci-après indiquées, ont été répétées deux fois, à un mois d'intervalle environ.

Les premières ont été effectuées le 9 août et les secondes les 12 et 13 septembre 1932. Tous les animaux appartenaient à l'exploitation A... à Nîmes (1).

Expérience n° 1. — Une première expérience a été entreprise sur 24 brebis primipares, saines, âgée de quinze à dix-huit mois, qui avaient reçu, chacune, le 19 juin 1932, 1 milliard de *Br. melitensis* vivants.

Le 9 août 1932, soit vingt jours après l'inoculation virulente, on effectue un prélèvement de sang en vue de la recherche du séro-diagnostic de Wright sur ces 24 brebis. Ensuite, on injecte à 12 de ces brebis, dans le *derme de l'un des plis de la queue*, 4/10 de centicube d'une *émulsion de « Br. abortus » tués*. Les animaux sont examinés chaque jour, pendant trois jours de suite. A la fin du troisième jour, on note 11 réactions locales positives et 1 négative.

D'autre part, les températures de chaque animal sont relevées trois heures, six heures, neuf heures, douze heures et vingt-quatre heures après l'inoculation dermique.

Le 9 août également, on injecte dans le derme de l'un des plis de la queue, aux 12 autres brebis infectées expérimentalement, 4/10 de centicube de *mélitine*. On note l'intensité de la réaction dermique au bout de un jour et de deux jours, mais les températures ne sont pas prises. A la fin du deuxième jour, on note 11 réactions dermiques positives et 1 négative.

Les tableaux I et II donnent toutes précisions sur les constatations qui ont été faites au cours de l'expérience précitée.

Expérience n° 2. — Un mois environ après les expériences précitées, jugées en partie insuffisantes, celles-ci ont été répétées sur *les mêmes animaux* et à l'aide des *mêmes antigènes*. Cette fois, on a recueilli le plus de renseignements possible sur les réactions observées.

Le 12 septembre 1932, 12 brebis du premier lot reçoivent de la *mélitine* (4/10 de centicube) dans le derme de l'un des plis de la queue. Le lendemain, 13 septembre, la même épreuve est faite avec la suspension de *Br. abortus* à 9 brebis sur 12 de l'autre lot, 3 brebis en période d'avortement n'ayant pu

(1) Je n'ai pu mener à bien cette longue et minutieuse expérimentation que grâce au concours de mon confrère M. Dautre, docteur vétérinaire à Nîmes, que je remercie ici très chaleureusement.

TABLEAU I. — *Mélicococle expérimentale. Résultats de l'intradermo réaction effectuée, le 9 août 1932, à l'aide d'une émulsion de Br. abortus.*

NUMÉROS des brebis	RÉACTION THERMIQUE Relevé des températures						RÉACTION thermique maximum	RÉACTION LOCALE Intensité après			SÉRO-DIAGNOSTIC de Wright
	lors de l'inoculation	3 heures après l'inoculation	6 heures après l'inoculation	9 heures après l'inoculation	12 heures après l'inoculation	24 heures après l'inoculation		1 jour	2 jours	3 jours	
26	38,9	39	39,5	39,7	39,8	39	0,8	0	0 +	+	0
27	38,8	39	39	39,1	39,3	39	0,3	+	+	+	0
28	39	39,2	40	40,4	40,4	38,8	4,4	0	0	0	+ 1/50
29	38,7	38,9	39,6	40,3	40,5	38,9	4,6	0	+	0 +	0
30	39	39	39,4	39,2	39,4	38,8	0,4	++	++	+	0
31	38,6	38,7	39	39,9	39	38,7	4,3	0 +	++	++	+ 1/30
32	38,9	39	40,2	40	40	38,8	1,3	0 +	+	0 +	0
33	39,4	39,4	39,6	39,5	39,8	39	0,7	0 +	+	++	0
34	38,7	39	39,4	39,6	39,4	38,8	0,9	0 +	+	0 +	+ 1/30
35	38,9	39,3	39,2	39	39,5	38,7	0,6	0	+	+	+ 1/30
36	38,8	38,8	40	40,3	40,2	39	1,5	0	0 +	0	0
37	39	39,2	40,3	40,5	40,8	39,2	1,8	+	+	++	+ 1/30

Nota. — 1^{er} Au jour de l'expérience, toutes les brebis étaient pleines.
2^o Trois brebis seulement ont présenté une réaction thermique égale ou supérieure à 1^o5.
Cela tient probablement : a) au fait surtout qu'aucune température n'a été relevée entre la douzième et la vingt-quatrième heure, période pendant laquelle se produit surtout l'hyperthermie; b) qu'il s'agit de brebis infectées expérimentalement seulement vingt jours avant l'intradermo-réaction.

Nota. — 1^o Au jour de l'expérience, toutes les brebis étaient pleines.

2^o Trois brebis seulement ont présenté une réaction thermique égale ou supérieure à 1^o5.

Cela tient probablement : a) au fait surtout qu'aucune température n'a été relevée entre la douzième et la vingt-quatrième heure, période pendant laquelle se produit surtout l'hyperthermie; b) qu'il s'agit de brebis infectées expérimentalement seulement vingt jours avant l'intradermo-réaction.

TABLEAU II. — *Mélitococcie expérimentale. Résultats de l'intradermo-réaction effectuée, le 9 août 1932, à l'aide de la mélitine.*

NUMÉROS DES BREBIS	RÉACTION LOCALE INTRADERMIQUE		SÉRO-DIAGNOSTIC de Wright
	Après 24 heures	Après 48 heures	
38	+	++	0
39	0 +	+	0
40	0 +	+	0
41	++	- +	+ 1/30
42	0 +	+	+ 1/30
43	0	0	0
44	++	++	+ 1/30
46	++	++	0
47	+	+	0
48	0 +	+	0
49	+	+	0
50	+	+	0

Nota. — Au jour de l'expérience, aucun avortement n'avait été relevé.

être utilisées. Les renseignements concernant ces expériences, et qui sont de même ordre que ceux déjà indiqués dans les expériences identiques faites précédemment, sont notés dans les tableaux III et IV.

APPRÉCIATION DES RÉSULTATS.

Des renseignements portés aux tableaux I et II, d'une part, et III et IV, d'autre part, résultent les constatations suivantes :

1° Dans l'expérience n° 1 (tableaux I et II), dans chaque lot de 12 brebis infectées, 11 ont eu une réaction positive soit avec la mélitine, soit avec *Br. abortus*. Au total, sur 24 brebis éprouvées vingt jours après leur infection expérimentale, 22 ont réagi à l'inoculation dermique, alors que le séro-diagnostic de Wright n'a signalé l'existence de l'infection que sur 8 de ces animaux.

Dans l'expérience n° 2 (tableaux III et IV), sur les 12 mêmes brebis infectées, la réaction dermique à l'aide de la mélitine a donné encore 11 résultats positifs et 1 négatif sur les mêmes sujets. Sur 9 autres brebis (lot des 12 de l'expérience n° 1) la même réaction à l'aide de *Br. abortus* a fourni 9 résultats positifs.

En résumé, les antigènes employés ont montré une grande sensibilité pour déceler l'infection mélitococcique. Sur 24 épreuves

TABLEAU III. — *Mélicoccie* expérimentale.
 Résultats de l'intradermo-réaction effectuée, le 12 septembre 1932, à 19 heures, à l'aide de la méline.

NUMÉROS DES BÉBIS	RÉACTION THERMIQUE Relève des températures							RÉACTION THERMIQUE maximum	RÉACTION LOCALE Intensité après						SÉRO-DIAGNOSTIC de Wright	GESTATION
	Température initiale	11 heures après l'inoculation	14 heures après l'inoculation	17 heures après l'inoculation	20 heures après l'inoculation	24 heures après l'inoculation			12 heures	24 heures	36 heures	48 heures	72 heures	96 heures		
38	39,3	39,8	40,1	40	40	39,7	40	0,8	0	+	+	+	+	+	0	Avortée 23 août.
39	39	40	39,8	39,7	40,4	40	40,4	1,4	+	+	+	+	+	0	+ 1/30	Avortée 16 août.
40	39,2	39,3	39,4	39,5	40,6	40,3	40,3	1,4	0	+	+	+	0	0	+ 1/30	
41	39,2	40,7	40,6	40,3	40	40,2	40,2	1,5	+	+	+	+	+	+	+ 1/30	
42	39,3	40,9	40,8	40,8	40,2	39,8	40,2	1,6	+	+	+	+	+	+	0	
43	39,4	40,2	40,3	40,2	40	40,3	40,3	1,2	0	+	0	+	0	0	0	Avortée 21 août.
44	39	40,2	40,7	41	40,8	40,7	40,7	2	+	+	+	+	+	+	0	
46	38,9	40,7	40,3	40,4	40,4	40,5	40,5	1,8	+	+	+	+	+	+	0	Avortée 16 août.
47	39,4	40,7	40,8	40,4	40,5	40,4	40,4	1,7	0	+	+	+	+	+	+ 1/30	
48	39,4	40,8	40,4	40,4	40,7	40,2	40,2	1,7	0	+	+	+	+	+	0	Avortée 2 septembre.
49	39,2	40,8	40,7	40,6	40,8	40,8	40,8	1,6	+	+	+	+	0	0	0	Avortée 4 septembre.
50	39,3	40,2	40,3	40,8	40,8	40,8	40,8	1,5	+	+	+	+	+	0	0	

TABLEAU IV. — **Mélicoccie expérimentale. Résultats de l'intradermo-réaction effectuée, le 13 septembre 1932, à 19 heures, avec l'émulsion de *Br. abortus*.**

NUMÉROS DES BÆBIS	RÉACTION THERMIQUE Relevé des températures							RÉACTION THERMIQUE maximum	RÉACTION LOCALE					Séro-DIAGNOSTIC de Wright	GESTATION
	Température initiale	11 heures après l'inoculation	14 heures après l'inoculation	17 heures après l'inoculation	20 heures après l'inoculation	24 heures après l'inoculation	24 heures après l'inoculation		12 heures	24 heures	36 heures	60 heures	72 heures		
27	39,4	40	40,5	40,6	40,8	40,2	40,2	1,4	0 +	0 +	0 +	+	+	+	Avortée 30 août.
28	39,3	40	40,3	40,5	40,4	39,9	39,9	1,2	0	0 +	0 +	+	+	0	
29	39,5	40,3	40,6	40,6	40,3	40,1	40,1	1,1	+	+	+	+	+	+	
30	39,3	39,5	40,7	40,3	40,1	40	40	1,4	0 +	0 +	+	+	+	0	
31	39,4	40,5	40,4	40,5	39,4	39,5	39,5	1,1	0	+	+	+	+	0	
32	39,1	41,2	41	40,6	40,3	39,8	39,8	1,5	0	0 +	+	+	0 +	0	
33	39,2	40	40,5	41,2	40,8	40,3	40,3	2	0	+	+	0 +	0	0	Avortée 29 août.
35	39,1	41	40,8	40,6	40,3	39,5	39,5	1,7	0	0 +	+	+	0 +	0	
36	39,3	39,6	39,4	39,8	39,4	39,3	39,3	0,5	0	0	0 +	+	0	+	

à la mélitine, 22 ont été positives, et sur 20 épreuves à l'émulsion de *Br. abortus* 20 ont été positives.

2° La réaction locale a présenté une intensité et une durée variables. L'œdème local apparaît, généralement, entre la douzième et la vingt-quatrième heure qui suit l'inoculation de l'antigène, s'accroît ensuite pour atteindre son maximum entre la trente-sixième et la quarante-huitième heure, puis décroît pour disparaître entre le quatrième et le dixième jour. Chez trois animaux (tableau IV), la réaction n'a été positive qu'au bout de deux jours et demi. Pratiquement, c'est le deuxième jour qu'il faut la rechercher.

La réaction est plus ou moins volumineuse selon les sujets.

Chez quelques animaux on trouve encore plusieurs semaines après l'inoculation un noyau induré de la grosseur d'un pois à une noisette.

3° La réaction locale s'accompagne souvent d'une réaction générale, caractérisée surtout par une hyperthermie marquée.

A signaler, notamment, qu'avec la mélitine, toutes les réactions locales positives, moins une, ont été accompagnées d'une réaction thermique comprise entre 1°4 et 2° (tableau III).

Cette constatation est très importante. Elle montre que l'injection dans le derme de cet antigène ne se traduit pas seulement par un œdème local, mais aussi presque toujours par une réaction générale caractérisée par une hyperthermie notable. Enfin, rarement d'ailleurs, on observe des signes de tristesse et d'inappétence.

Ainsi peut-on rapprocher les effets de cette épreuve de ceux observés chez les bovidés tuberculeux soumis à l'épreuve de la tuberculine. Cette constatation met en évidence, une fois de plus, les points de contact qui existent entre la mélitococcie et la tuberculose.

4° La réaction allergique a été observée chez presque tous les ovidés, vingt jours après que ceux-ci avaient reçu une inoculation de *Br. melitensis* vivants. La réaction est donc précoce.

5° Une première injection de l'antigène spécifique ne provoque pas l'accoutumance, puisque, dans la première expérience, sur 24 bêtes infectées, 22 ont réagi, et, dans la seconde, sur 21 de ces mêmes bêtes déjà éprouvées, 20 ont réagi.

Une première injection d'antigène sensibilise plutôt l'orga-

nisme chez les sujets infectés. La réaction est apparue, en effet, plus tôt chez les animaux qui avaient été soumis antérieurement à l'épreuve de la mélitine ou de l'émulsion brucellique.

TABLEAU V. — *Mélitococcie* naturelle. Résultats de l'intradermo-réa-

NUMÉROS DES BREBIS (1)	RÉACTION THERMIQUE Relevé des températures							RÉACTION THERMIQUE
	lors de l'inoculation (2)	2 heures après l'inoculation	5 heures après l'inoculation	7 heures après l'inoculation	10 heures après l'inoculation	23 heures après l'inoculation	25 heures après l'inoculation	
1	39,2	39,3	39,3	39,7	38,7	39	39,3	0
2	39,2	39,4	39,9	41	40,6	40	39,7	4
3	39	39,1	39,3	39	38,2	38,6	39	0
4	38,8	38,6	39	39,3	39,3	40,5	39,5	4
5	39,3	39,2	39,4	39,2	40,4	39,6	38,7	4
6	39	39,1	39,7	40,8	41,3	39,9	39,5	2
7	39,4	39,6	40	41	41,2	41	40	2
8	38,3	39,4	39,9	40,5	40,6	40,6	40,2	4
9	39,3	39	39,3	39	38,8	40,3	39,8	4
10	39	39,4	39	39,6	40	40,6	40	4

NUMÉROS des brebis (1)	RÉACTION THERMIQUE Relevé des températures					RÉAC therm maxim
	lors de l'inoculation (2)	13 heures après l'inoculation	16 heures après l'inoculation	19 heures après l'inoculation	23 heures après l'inoculation	
11	38,6	40,8	40,4	40,3	40,1	2,
12	38,5	40,5	40,7	40,4	40,2	2,
13	39	41	40,5	41,4	40,9	2,
14	39,6	39,5	39,7	40	40	0,
15	39,5	39,3	39,9	40,3	40,3	0,
16	39,8	39,3	39,4	40,3	40	0,
17	38,8	41,6	41,1	41	40	2,
18	39	38,7	39,1	39	39	0,
19	39,2	41,2	41	40,8	39,4	2,
20	38,8	39	39,4	40	39,4	1,

(1) Il s'agit d'une nouvelle notation, les animaux ayant dû être pour la plupart, à nouveau marqués.
(2) Les brebis de 1 à 10 ont subi l'inoculation intradermique le 15 mars, à 8 heures et celles de 11 à 20, le 16 mars, à 8 heures. Les brebis de 11 à 15 ont été inoculées respectivement deux, cinq, sept, dix, vingt-trois et vingt-cinq heures après l'inoculation; pour les dix autres, à 24 heures.

II. — MÉLITOCOCCIE NATURELLE.

Les considérations qui viennent d'être exprimées sur les résultats de la réaction allergique chez les ovidés atteints de

mélitococcie expérimentale s'appliquent presque complètement aux ovidés atteints de mélitococcie naturelle. Le tableau n° V donne les renseignements recueillis sur 20 brebis infectées

ectuée, le 15 mars 1932, avec *Br. abortus*.

RÉACTION LOCALE Intensité après				SÉRO-DIAGNOSTIC de Wright	ÉTAT DE LA GESTATION
1 jour	2 jours	3 jours	4 jours		
0	0 +	+	+	0	Stérile.
+	+	++	+	+ 1/30	Avortée.
+	+	+	0 +	0	Avortée.
0	+	+	0 +	0	Stérile.
0	0	0	0	0	Stérile.
0 +	+	++	+	0	Avortée.
0	+	+	0 +	+ 1/30	Avortée.
0 +	+	+	+	0	Avortée.
0	0	0	0	0	Stérile.
0 +	+	++	+	0	Stérile.

RÉACTION LOCALE Intensité après				SÉRO-DIAGNOSTIC de Wright	ÉTAT DE LA GESTATION
1 jour	2 jours	3 jours	4 jours		
0	0 +	0 +	++	0	Avortée.
++	+++	+++	++	+ 1/100	Avortée.
+	+	+	0 +	1/50	Avortée.
0	0	0	0	0	Mise bas normale, allaite.
0	0	0	0	+ 1/50	Mise bas normale, allaite.
0	0	0	0	+ 1/50	Mise bas normale, allaite.
+	++	++	+	0	Avortée.
0	0	0	8	0	Non pleine.
0	0	0 +	+	0	Mise bas normale, allaite.
0	0	0	0	0	Non pleine.

le même jour à 18 heures. Pour les dix premières brebis, les températures ont été prises respectivement à 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 heures après l'inoculation. Pour les dix dernières brebis, les températures ont été prises, treize, seize, dix-neuf et vingt-trois heures après l'inoculation.

naturellement et qui ont été soumises à l'inoculation d'une émulsion de *Br. abortus* tués. Sur 20 brebis, 13 ont donné une réaction dermique positive qui, pour 11 d'entre elles, a été accompagnée d'une hyperthermie ayant duré de six à

TABLEAU VI. — Résultats de l'intradermo-réaction effectuée chez 20 ovidés atteints de mélitococcie naturelle.

NUMÉROS des brebis	RÉACTION THERMIQUE Relevé des températures				
	lors de l'inoculation	3 heures après l'inoculation	6 heures après l'inoculation	10 heures après l'inoculation	24 heures après l'inoculation
1.	38,8	39	39,1	38,7	38,8
2.	38,9	39	40	40,1	38,8
3.	38,7	39	39,6	39,3	38,8
4.	38,9	39	40	40,6	39,1
5.	38,8	39,5	40	39	38,8
6.	38,7	38,8	40	39	38,8
7.	38,7	39	39,1	39,4	39,1
8.	38,7	39	39,3	39,2	39,1
9.	38,6	38,8	39,2	39,2	38,8
10.	38,7	38,8	39,2	39,2	38,8
NUMÉROS des brebis	RÉACTION THERMIQUE Relevé des températures				
	lors de l'inoculation	13 heures après l'inoculation	16 heures après l'inoculation	19 heures après l'inoculation	23 heures après l'inoculation
11.	39,1	39	39,2	39,5	39,1
12.	38,7	39	39,3	39,1	39,1
13.	38,9	39	39,6	40	39,1
14.	39	39,2	39,2	39	39,1
15.	38,9	39	39,3	39,6	39,1
17.	39,1	38,8	39,1	39,3	39,1
18.	38,7	39,5	39,6	39,5	39,1
19.	39,1	39,2	39,2	39,2	39,1
20.	39,2	39	39	39	39,1

Nota. — Pour les brebis marquées de 1 à 10, l'inoculation a été faite le matin et les températures ont été relevées le soir et la prise des températures n'a eu lieu qu'à partir de la troisième heure.

dix heures et dont le maximum a été compris entre 1°6 et 2°4.

A ce propos, précisons que, lorsqu'on voudra noter les variations thermiques, il conviendra de pratiquer, de préférence, l'inoculation de l'antigène, le soir, et de prendre les températures toutes les deux ou trois heures, à partir de la neuvième et jusqu'à la vingtième heure.

avec une émulsion de corps microbiens de *B. typhiques* tués,
l'expérience faite les 30 et 31 mars et 1, 2 et 3 avril 1932.

	RÉACTION thermique maximum	RÉACTION locale maximum 1, 2, 3, 4 jours après l'inoculation	OBSERVATIONS
7 heures après inoculation			
39,1	0,3	0	A présenté une petite réaction locale non positive (0+) d'une durée de 12 heures dans les 24 heures qui ont suivi l'inoculation.
39,2	1,2	0	
39,2	0,9	0 +	A présenté une petite réaction locale (à partir de la douzième heure) non positive (0+) d'une durée de moins de 24 heures.
39,3	1,7	0 +	
39,2	1,2	0	
39,2	1,3	0	
39,2	0,7	0	
39,2	»	0	
39,1	0,6	0	
38,9	0,5	0	
RÉACTION thermique maximum	RÉACTION locale maximum 1, 2, 3, 4 jours après l'inoculation	OBSERVATIONS	
0,4	0		
0,6	0		
1,1	0		
0,5	0		
0,7	0		
0,2	0		
0,9	0		
0,1	0		
»	0		

ont été prises à partir de la troisième heure après celle-ci. Pour les brebis marquées de 11 à 20, 12 heures.

CHAPITRE II

Expériences de contrôle.

L'expérimentation qui vient d'être rapportée, faite sur des ovins atteints de mélitococcie expérimentale ou naturelle,

TABLEAU VII. — Résultats de l'intradermo-réaction à l'aide d'une émulsion indemne de *mélitococcie*. Expérience des 21, 22, 23, 24 et 25 mars 1932.

SEXE ET NUMÉROS des ovidés	RÉACTION THERMIQUE Relevé des températures				
	lors de l'inoculation	3 heures après l'inoculation intra- dermique	6 heures après l'inoculation intra- dermique	10 heures après l'inoculation intra- dermique	24 heures après l'inoculation intra- dermique
Bélier 1	39	39,3	39,3	39,4	39,4
Mouton 2	39,4	40	40,4	39,9	40
Mouton 3	38,9	39	39,2	38,8	38,9
Brebis 4	39,4	39,3	39,4	40,3	40,3
Brebis 5	39	39	38,9	38,9	38,9
Brebis 6	39,3	39,2	39,6	39,2	39,2
Brebis 7	39,4	40,2	40,3	40,1	39,4
Brebis 8	39	38,9	39,2	39,5	39,5
Brebis 9	39,2	38,9	39,4	39,2	39,2
Brebis 10	39,3	40	40	39,3	38,9

SEXE ET NUMÉROS des ovidés	RÉACTION THERMIQUE Relevé des températures				
	lors de l'inoculation	14 heures après l'inoculation intra- dermique	17 heures après l'inoculation intra- dermique	20 heures après l'inoculation intra- dermique	23 heures après l'inoculation intra- dermique
Mouton 11	38,9	38,9	38,8	39,3	39,3
Mouton 12	38,9	39	39,1	39,3	39,3
Bélier 13	39,4	39,1	39,2	39,3	39,3
Mouton 14	39,2	39,7	39,5	39,6	39,6
Mouton 15	39,3	39	39	39,2	39,3
Mouton 16	39,3	39	39,1	39,3	39,3
Mouton 17	39,4	39,3	39,2	39,4	39,4
Mouton 18	38,9	39	39,1	39,3	39,3
Mouton 19	39,4	39,1	39	39,3	39,3

soumis à l'inoculation intradermique effectuée avec la mélitine ou l'émulsion de *Br. abortus*, a été complétée par les trois expériences suivantes :

EXPÉRIENCE N° 1. — Recherche des réactions observées chez des vœins atteints de *mélitococcie* naturelle (1) soumis à l'intradermo-

(1) Les mêmes que ceux signalés au Tableau n° V.

ps microbiens de *Br. abortus* tués chez des ovidés cliniquement et sérologiquement
ploitation D..., à Saint-Césaire-les-Nîmes. Vétérinaire : M. Doutre, à Nîmes.

	RÉACTION thermique maximum	RÉACTION locale 1, 2, 3, 4 jours après l'inoculation	SÉRO-DIAGNOSTIC de Wright	OBSERVATIONS
7 heures après inoculation intra- dermique				
38,9	0,3	0	0	A mis bas le lendemain de l'inoculation d'un produit vivant à terme.
"	0,9	0	0	
"	0,4	0	0	
39,3	0,9	0	0	
"	0,1	0	0	
38,4	0,3	0	0	
"	0,9	0	0	
"	0,5	0	0	
"	0,2	0	0	
"	0,7	0	0	
	RÉACTION thermique maximum	RÉACTION locale 1, 2, 3, 4 jours après l'inoculation	SÉRO-DIAGNOSTIC de Wright	OBSERVATIONS
0 heures après inoculation intra- dermique				
38,8	0,4	0	0	Une petite réaction locale (0 +) non positive apparue le premier jour. A disparu 12 heures après.
38,9	0,4	0	0	
39	"	0	0	
40	0,8	0 +	0	
39,9	0,6	0	0	
39,2	"	0	0	
39,1	"	0	0	
39	0,4	0	0	
39,2	"	0	0	

tion effectuée à l'aide d'une émulsion de *B. typhiques* tués
(eau n° VI).

EXPÉRIENCE N° 2. — Recherche des réactions observées chez des
s cliniquement et sérologiquement indemnes de mélitococcie,
vis à l'intradermo-réaction effectuée à l'aide d'une émul-
de *Br. abortus* tués (Tableau n° VII).

Les résultats portés au Tableau n° VI établissent *qu'aucune réaction locale positive n'a été observée*. Les deux œdèmes locaux, de faible volume, qui ont à peine duré une douzaine d'heures, constituent des pseudo-réactions. Quant à l'hyperthermie, elle a été, en général, peu accentuée. La réaction de 1°7, présentée par la brebis n° 4, était due, probablement, à ce que celle-ci était en train d'avorter.

Les résultats indiqués au Tableau n° VII sont encore plus démonstratifs. Les réactions locales ont été toutes négatives et elles n'ont été accompagnées que d'une hyperthermie faible, qui n'a atteint, au maximum, que 0°9.

En résumé, tous ces résultats sont nettement en faveur de la spécificité de la réaction dermique.

EXPÉRIENCE N° 3. — *Résultats de l'intradermo-réaction pratiquée à l'aide de l'émulsion de Br. abortus tués sur des ovidés sains, en des régions indemnes de mélitococcie.*

Cette expérience de contrôle était indispensable à effectuer pour juger de la valeur spécifique de la réaction allergique.

Dans l'impossibilité où nous étions de pouvoir trouver, dans le Gard, un nombre important d'animaux, sûrement indemnes de mélitococcie et n'ayant jamais eu de contact avec des sujets infectés, nous avons dû chercher d'autres régions, en France, où cette expérience pût être effectuée avec toutes les garanties scientifiques désirables.

Mes collègues MM. Brune et Sausseau, Directeurs des Services vétérinaires, ont bien voulu procéder à cette expérimentation dans leurs départements respectifs. Nous les remercions infiniment de la précieuse collaboration qu'ils nous ont apportée en la circonstance.

Voici les constatations qu'ils ont faites à la suite de l'inoculation, dans le derme d'un des plis de la queue, de 4/10 de centimètre d'une émulsion de *Br. abortus* tués.

I. — EXPÉRIENCES FAITES PAR M. BRUNE SUR DES OVIDÉS D'EURE-ET-LOIR ET DE LA SARTHE.

1° Troupeau de M. F... à B... :

22 brebis, croisement berrichon, Ile-de-France; âgées, vides. Inoculation le 16 juillet 1932.

Visite de contrôle le 17 juillet, trente-six heures environ après l'inoculation; *aucune réaction*.

2° Troupeau de M. C... à S... :

33 sujets, issus de croisements divers, âgés de deux à cinq ans (32 brebis pleines ou présumées telles, et 1 bélier).

Inoculation le 26 août 1932.

Visite de contrôle le 28 août 1932. *Aucune réaction*.

3° *Troupeau de M. H... à A...* :

63 brebis âgées, vides, de race berrichonne, Ile-de-France, provenant de plusieurs lots achetés en Eure-et-Loir et dans les départements voisins.

Inoculation le 7 septembre 1932.

Visite de contrôle le 8 septembre et le 9. *Aucune réaction.*

4° *Troupeau de M. P... à F...* :

243 brebis de trois à cinq ans, 1 bélier, 8 agneaux, tous de race Dishley-mérinos, et de divers croisements.

Inoculation le 10 septembre.

Visite de contrôle le 12 septembre : *une pseudo-réaction et 251 réactions négatives.*

Visite de contrôle le 13 septembre. *Aucune réaction* chez tous les animaux.

5° *Troupeau de M. D... à I...* :

79 sujets (1 bélier, 64 brebis de deux à quatre ans, 14 agneaux ; les adultes : Dishley-mérinos ; les agneaux, croisements Charmois-Dishley-mérinos).

Inoculation le 10 septembre 1932.

Visite de contrôle les 12 et 13 septembre. *Aucune réaction.*

6° *Troupeaux de MM. R... à H..., A... à P... et F... à S...* : comprenant au total, 4 béliers, 6 agnelles et 9 brebis.

Inoculation le 16 septembre 1932.

Les animaux ont été revus après vingt-quatre et quarante-huit heures. *Aucune réaction n'a été observée.*

En résumé, sur 433 brebis, 7 béliers et 28 agneaux, il n'a été observé aucune réaction positive à la suite de l'injection de l'antigène brucellique.

II. — EXPÉRIENCE FAITE PAR M. SAUSSEAU SUR DES OVIDÉS DES DEUX-SÈVRES.

Troupeau de 152 ovidés comprenant 74 brebis de deux à six ans, toutes saines, 16 moutons de dix-huit mois, 1 bélier, 65 agneaux et agnelles de cinq à six mois.

« L'inoculation a été pratiquée le 11 juillet. Les sujets ont été examinés « vingt-quatre, quarante-huit et soixante-douze heures après l'injection. « Aucun d'eux n'a présenté de réaction appréciable. L'effet du produit injecté « a paru absolument nul. »

En conclusion, il résulte des deux expériences précitées que 620 ovidés, indemnes de mélitococcie, soit 503 brebis, 8 béliers, 16 moutons et 93 agneaux, n'ont donné aucune réaction à la suite de l'injection de l'émulsion de *Br. abortus* tués.

CHAPITRE III

I. — Principaux caractères de la réaction allergique.

1° L'émulsion de *Br. abortus*, aussi sensible que la mélitine, pour déterminer la réaction locale, *principale manifestation de l'état d'allergie*, est l'antigène de choix. Commode et peu coûteuse à préparer, elle conserve, indéfiniment, son activité, alors

que la mélitine, entre autres inconvénients, ne conserve son activité que pendant un temps parfois très limité.

2° La réaction allergique se traduit par un œdème local et une réaction générale caractérisée surtout par une hyperthermie marquée. Cette dernière apporte un élément complémentaire utile pour l'établissement du diagnostic. La réaction thermique paraît cependant moins constante que celle observée chez les bovidés tuberculeux soumis à l'injection sous-cutanée de tuberculine.

3° L'inoculation intradermique étant *correctement faite*, et *les animaux inoculés étant examinés pendant le temps voulu*, c'est-à-dire pendant 1, 2, 3 et 4 jours, les défaillances de la réaction locale paraissent rares alors que celles de la réaction thermique semblent plus fréquentes. En tout cas, ces défaillances sont beaucoup moins fréquentes que celles que l'on constate par l'emploi du séro-diagnostic de Wright.

4° L'antigène brucellique ne produit pas l'accoutumance, mais plutôt la sensibilisation plus grande de l'organisme.

5° La réaction allergique est précoce et paraît devoir persister pendant longtemps.

EXPÉRIENCE N° 4. — *Résultats obtenus à la suite d'injections successives, dans le derme du pli caudal, de Br. abortus tués, chez des ovins indemnes de mélitococcie (Exploitation S....., à Nîmes. Vétérinaire M. Dautre.*

Chez cinquante moutons qui avaient présenté, le 17 décembre 1932, une première intra-dermo réaction négative, trois autres injections dermiques, toujours avec l'émulsion de *Br. abortus*, ont été pratiquées, en alternant le pli caudal, les 19 et 29 décembre 1932 et le 13 janvier 1933.

Les animaux ont été revus, après chaque épreuve, douze, vingt-quatre, quarante-huit et soixante-douze heures après l'inoculation.

Les résultats ont été constamment négatifs. Aucune réaction locale n'a été observée.

II. — Preuves de la spécificité de la réaction allergique.

La réaction allergique est dite positive lorsqu'elle se traduit par un œdème local, accompagné ou non d'hyperthermie (1).

(1) En l'absence de réaction locale, il n'a pas été constaté d'hyperthermie marquée.

Cette réaction est spécifique de l'infection mélitococcique ainsi qu'il résulte des constatations suivantes :

1° Chez les ovidés infectés expérimentalement par *Br. melitensis*, la réaction locale a été observée chez la totalité des animaux éprouvés par l'émulsion de *Br. abortus* et la presque totalité de ceux inoculés avec la mélitine.

La réaction locale a été, le plus souvent, accompagnée d'une hyperthermie marquée qui s'est manifestée, généralement, entre la neuvième et la vingtième heure, après l'inoculation ;

2° La réaction allergique (œdème local et hyperthermie) a été observée également chez les ovidés atteints de mélitococcie naturelle ;

3° On n'a observé ni réaction locale, ni réaction thermique marquée :

a) Chez des ovidés atteints de mélitococcie naturelle éprouvés avec une émulsion de *B. typhiques* ;

b) Chez des ovidés cliniquement et sérologiquement indemnes de mélitococcie, éprouvés avec une émulsion de *Br. abortus*.

4° On n'a observé aucune réaction locale positive, chez 620 ovidés sains appartenant à des régions indemnes de mélitococcie (Sarthe, Eure-et-Loir, Deux-Sèvres) inoculés avec une émulsion de *Br. abortus*.

5° Les injections successives de *Br. abortus*, tués, dans le derme du pli caudal ne produisent aucune réaction totale chez les ovidés sains.

Conclusions.

1° La technique de choix pour rechercher la réaction allergique chez des ovidés suspects de mélitococcie consiste à injecter dans le derme d'un des plis sous-caudaux, 4/10 de centicube d'une émulsion de *Br. abortus* tués.

Cet antigène donne des résultats comparables à ceux obtenus avec la mélitine. Son principal avantage, qui justifie son emploi, est qu'il conserve indéfiniment son activité, alors que la mélitine n'est active, le plus souvent, que pendant très peu de temps.

2° La réaction allergique est caractérisée, essentiellement, par un œdème plus ou moins volumineux, au point d'inocula-

tion, d'une durée de plusieurs jours, et qui s'accompagne, généralement, d'une hyperthermie marquée.

Dans un troupeau soumis à l'intradermo-réaction, c'est le deuxième jour qu'il convient, pratiquement, de rechercher la réaction d'allergie.

3° La réaction allergique survient peu de temps après l'infection et persiste longtemps après celle-ci. Elle est donc à la fois précoce et durable.

4° Les défaillances de la réaction paraissent rares. Son emploi répété chez les mêmes sujets infectés, à un court intervalle, ne produit pas l'accoutumance, mais plutôt la sensibilisation de l'organisme.

5° Des constatations suivantes, il résulte que la réaction allergique, faite suivant la technique qui a été indiquée, est spécifique de l'infection mélitococcique :

I. La réaction allergique est presque constamment observée chez les ovins atteints d'infection expérimentale ou naturelle;

II. L'injection de *B. typhique* à ces animaux ne produit aucune réaction;

III. La réaction allergique, pratiquée avec l'émulsion de *Br. abortus*, n'a pas été constatée une seule fois sur plus de 600 ovidés sains appartenant à des régions indemnes de mélitococcie.

6° En conclusion, la recherche de la réaction d'allergie constitue un procédé pratique et suffisamment sûr de diagnostic de la mélitococcie ovine, ce qui implique donc, désormais, l'abandon du séro-diagnostic de Wright.

7° Une nouvelle prophylaxie, basée sur la recherche de la réaction allergique, doit être mise en œuvre pour lutter contre la mélitococcie.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LA PATHOGÉNIE DE LA MÉNINGITE CÉRÉBRO-SPINALE ET SUR LA VIRULENCE DES MÉNINGOCOQUES

par le Professeur P. ZDRODOWSKI,

Chef de la Section Epidémiologique de l'Institut de Médecine Expérimentale
de Léninegrad.

Dans un premier Mémoire publié ici-même en collaboration avec E. Voronine, nous avons fait part de nos recherches sur la méningite cérébro-spinale expérimentale chez le lapin et sur l'immunologie dans la méningococcie (1). Le présent Mémoire résume nos observations ultérieures concernant l'infection méningococcique. Le problème de la pathogénie de la méningite cérébro-spinale et celui de la virulence des méningococques font le sujet principal de ce Mémoire.

PREMIÈRE PARTIE

1. — La méningite cérébro-spinale et la méningococcie d'après les recherches expérimentales.

« Pendant longtemps, dit Ch. Dopter, on a considéré la
« méningite cérébro-spinale comme une entité morbide bien
« définie. On sait actuellement qu'elle n'est qu'une des mani-
« festations de la méningococcie et très vraisemblablement
« une localisation secondaire et éventuelle de la septicémie
« méningococcique. Le rhino-pharynx est la porte d'entrée
« du méningocoque. Il végète et pullule au niveau de la
« muqueuse et des formations lymphatiques. Il pouvait s'y
« cantonner et ne pas franchir la première étape rhino-pharyn-

(1) Ces *Annales*, n° 5, 1932.

gée des porteurs de germes; mais en d'autres circonstances, et à la faveur d'un fléchissement de la résistance organique, il envahit l'organisme pour y déterminer les lésions connues de la méningococcie, et notamment des lésions méningées. »

Telle est la conception actuelle de la nature et de la pathogénie de la méningite cérébro-spinale, d'après la belle explication de Ch. Dopter (1). Nous avons essayé d'appuyer cette conception par des faits d'ordre expérimental.

Comme nous l'avons montré, l'injection de méningocoque, directement dans la cavité sous-arachnoïdienne, provoque chez le lapin la méningite cérébro-spinale avec septicémie méningococcique secondaire. Il était intéressant d'essayer s'il est possible de reproduire chez ces animaux des lésions méningées, grâce à une septicémie méningococcique primaire. Dans le cas d'un résultat positif, nous aurions alors une preuve expérimentale en faveur de la conception actuelle de la pathogénie hémotogène de la méningite méningococcique. Mais le problème posé exigeait avant tout d'étudier en détail la possibilité de reproduire chez le lapin la septicémie méningococcique en général.

a) RECHERCHES SUR LA SEPTICÉMIE MÉNINGOCOCCIQUE PRIMITIVE
CHEZ LES LAPINS.

Nous avons injecté par voie intraveineuse une série de lapins avec une dose massive (5 milliards), d'une culture de méningocoques (B-126). Ensuite, nous avons cherché, à des intervalles variés, à déceler la septicémie méningococcique chez ces animaux. Dans ce but, nous avons ensemencé 5 à 6 cent. cubes de leur sang, obtenu par la ponction du cœur, dans des ballons contenant 50 cent. cubes de peptone glucosée de Martin. Les résultats de ces expériences sont présentés dans le tableau I.

Comme on peut le voir en examinant le tableau I, l'injection intraveineuse de méningocoques produit chez les lapins une septicémie méningococcique vraie et assez prolongée. Notons, en outre, que les hémocultures obtenues étaient toujours

(1) CH. DOPTER. *L'Infection méningococcique*, 1924, p. 47.

TABLEAU I. — Infection par voie veineuse des lapins et septicémie méningococcique primaire.

NUMÉRO des lapins	PO. OS	DOSE D'ESSAI en milliards	HÉMOCULTURE APRÈS									
			3 minutes	15 minutes	30 minutes	1 heure	3 heures	6 heures	9 heures	12 heures	24 heures	36 heures
178	1.550	5	+			+						
92	1.360	5		+			+					
51	1.400	5			+			+				
825	1.360	5						+				
179	1.350	5							+			
195	1.620	5								+	+	
18	1.750	5										+

Le signe + indique culture positive.

abondantes, c'est-à-dire que les méningocoques pullulent énergiquement dans l'organisme du lapin.

Ainsi, la septicémie méningococcique « primitive » peut être réalisée chez les lapins.

6. LA SEPTICÉMIE MÉNINGOCOCCIQUE PRIMITIVE ET LES LÉSIONS MÉNINGÉES SECONDAIRES CHEZ LES LAPINS.

L'infection méningococcique par voie veineuse ne provoque pas en général chez les lapins de symptômes méningés bien spéciaux. Nous en avons conclu dans notre premier Mémoire que ce mode d'infection ne donne aucun résultat. Nous n'avions pas alors d'observations assez nombreuses à ce sujet. Nous avons renouvelé ces recherches, en les effectuant systématiquement à l'aide de techniques plus délicates et plus précises.

Le schéma des expériences entreprises était le suivant : les lapins ont été injectés par voie intraveineuse avec des doses modérées ou massives (3 à 5 milliards) de méningocoques. Tout de suite après l'injection, une série de lapins a été soumise au « pompage » d'après Speranski (évacuation répétée du liquide céphalo-rachidien). Une autre série d'animaux reste dans les conditions ordinaires de l'infection par voie veineuse (sans

pompage). Après six heures, vingt-quatre heures et trente-six heures, on fait chez tous les animaux la ponction occipitale pour examen microscopique et bactériologique du liquide céphalo-rachidien ; en même temps, on les observe soigneusement au point de vue clinique. Les résultats de ces études sont présentés dans le tableau II.

TABLEAU II. — Infection méningococcique par voie veineuse primitive et infection méningée secondaire chez les lapins.

NUMÉROS des lapins	POIDS	CULTURE	DOSE D'ESSAI en milliards de germes	POMPAGE	EXAMENS DU LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN après les ponctions					
					6 heures		24 heures		36 heures	
					Leucocytes	Méningocoques	Leucocytes	Méningocoques	Leucocytes	Méningocoques
48	1.750	B-110	5	0	0	+			++	+
15	1.300	B-110	5	0	0	+			+	+
18	1.450	B-182	5	0			0	+		
196	1.600	A-55	5	0			2	+		
149	1.400	A-196	5	0			0	0		
825	1.700	A-196	5	+			+++	+	Méningite expliquée.	
499	1.700	A-196	5	+			++	+		
99	1.400	A-196	5	+			2	+		
2	1.450	B-182	5	+			0	+		
5	1.650	B-182	5	+			0	0		

Les signes indiquent : A, pour les leucocytes, 0, absence ; +, rares ; ++, quantité modérée ; +++, très nombreux ; B, méningocoques, 0, culture négative ; +, culture positive.

Nous voyons, que l'examen bactériologique montre la présence de méningocoques dans le liquide céphalo-rachidien chez presque tous les lapins soumis à l'injection intraveineuse. On trouve ces germes dans le liquide dès la sixième heure après l'injection intraveineuse, on les décèle encore après trente-six heures. On constate également que le pompage n'est pas indispensable pour la pénétration des méningocoques dans la cavité sous-arachnoïdienne. Quant au liquide céphalo-rachidien il peut rester normal, ou bien il peut contenir telle ou telle quantité de leucocytes, ou bien encore il peut devenir purulent.

L'infection méningée demeure en général sans symptômes cliniques marqués ; seulement dans certains cas on observe une méningite plus ou moins marquée. En somme, nos recherches ont montré, que les méningocoques administrés dans la veine pénètrent régulièrement dans la cavité sous-arachnoïdienne. Cependant, grâce à la résistance marquée des lapins, l'accumulation modérée des méningocoques dans le système nerveux ne donne lieu à aucun symptôme et provoque seulement quelquefois des lésions méningées de degré variable. Nos expériences confirment néanmoins la conception actuelle sur l'origine hémotogène de la méningite cérébro-spinale.

c) INFECTION MÉNINGÉE PRIMITIVE

ET SEPTICÉMIE MÉNINGOCOCCIQUE SECONDAIRE CHEZ LES LAPINS.

L'injection de méningocoques dans la cavité sous-arachnoïdienne provoque chez les lapins une méningite cérébro-spinale. Dans les cas mortels l'examen bactériologique montre régulièrement la présence des méningocoques dans le sang. Ainsi l'infection méningée primaire provoque chez les lapins la septicémie méningococcique secondaire. Il nous a semblé intéressant d'étudier plus en détail ce phénomène.

TABLEAU III. — Infection méningée primaire et septicémie méningococcique secondaire chez les lapins.

NUMÉROS des lapins	POIDS	DOSE D'ESSAI en milliards de germe	HÉMOCULTURE APRÈS									
			15 minutes	30 minutes	1 heure	3 heures	6 heures	9 heures	12 heures	24 heures	36 heures	50 heures
179	1.400	2	+	+	+							+
186	1.570	2			+					+		
185	1.470	2				+		+				
147	1.520	2					+		+			
86	1.450	0,5									+	

Le signe + indique culture positive.

Dans ce but nous avons infecté par voie sous-arachnoïdienne, un lot des lapins. Ensuite nous avons examiné bactériologi-

quement le sang recueilli par ponction du cœur faite à des différents intervalles de temps (voir plus haut la technique desensemencements du sang). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III.

Ainsi les méningocoques introduits dans la cavité sous-arachnoïdienne envahissent très rapidement l'organisme du lapin. La rapidité de la généralisation de l'infection méningococcique est très grande. Lesensemencements du sang quinze minutes après l'infection par voie sous-arachnoïdienne donnent déjà une culture abondante. En se basant sur les expériences exposées ci-dessus, on peut supposer que la septicémie méningococcique d'origine secondaire est constante également dans les cas de la méningite cérébro-spinale humaine. Il faut donc interpréter la méningite cérébro-spinale comme une infection générale.

2. — Analyse expérimentale du pouvoir pathogène des méningocoques.

Nous avons montré, dans notre première série de recherches sur la méningite expérimentale, que l'injection sous-arachnoïdienne d'une dose suffisante des méningocoques tués par la chaleur provoque chez les lapins certains symptômes morbides. En liaison avec ces observations préliminaires nous avons entrepris des recherches spéciales sur l'action d'endotoxines méningococciques dans le but d'examiner plus complètement le pouvoir pathogène des méningocoques.

Les expériences d'introduction sous-arachnoïdienne de méningocoques tués par le chauffage ont confirmé complètement les résultats de nos recherches antérieures. Les lapins traités de cette manière répondent par une réaction bien caractérisée. Ils manifestent, quelques heures après l'injection de méningocoques tués, une polypnée bien marquée et une élévation de la température jusqu'à 40° C et plus. Dans les cas d'intoxication plus grave, on observe aussi des phénomènes intenses d'irritation nerveuse. L'exagération de la sensibilité périphérique est particulièrement caractéristique chez les animaux intoxiqués. Une simple excitation provoque chez l'animal des mouvements convulsifs. L'animal excité donne l'im-

pression de délire. Cependant tous ces symptômes sont transitoires et le lapin se rétablit dans les deux à quatre jours. Mais, plus tard, une cachexie progressive peut se développer.

Ce tableau de l'intoxication se reproduit chez les lapins après l'injection sous-arachnoïdienne de l'émulsion de méningocoques tués à 60° ou à 100°C et injectés à des doses ordinaires, ou doubles (2-4 milliards) de la DLM de culture vivante. Nos recherches ultérieures ont montré, que ce même tableau d'intoxication aiguë et transitoire se développe aussi avec les cultures vivantes, devenues avirulentes par repiquages sur le sérum coagulé.

Ainsi la culture méningococcique vivante et virulente cause chez les lapins la méningite mortelle. La même culture vivante, mais dépourvue de sa virulence ou la même culture tuée par la chaleur, aux mêmes doses ou à des doses doubles, provoque une intoxication aiguë, mais transitoire.

Nous voyons donc que les expériences différencient très nettement deux facteurs dominants du pouvoir pathogène du méningocoque : la virulence et la toxicité. Les deux propriétés coexistent dans la culture, mais le facteur virulent est plus labile et peut disparaître, quand la culture conserve encore son pouvoir toxigène. Notons que nos études sur ce point concordent bien avec les données analogues de Murray (1929).

La nature complexe de l'action pathogène du méningocoque et l'importance réelle des relations mutuelles des propriétés virulente et toxigène pour la pathogénie de la méningite apparaissent nettement dans les essais suivants.

Nous avons examiné l'influence de l'émulsion méningococcique bouillie (endotoxine activée par le chauffage à 100° C d'après Murray) sur le pouvoir virulent des méningocoques vivants en ajoutant des quantités différentes de l'émulsion stérilisée aux doses décroissantes et non mortelles de la culture vivante homologue. Les mélanges ainsi préparés ont été injectés dans la cavité sous-arachnoïdienne des lapins en ayant soin de réserver des animaux témoins. Les conditions des expériences et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau IV.

Comme on peut le voir d'après ce tableau, l'addition de méningocoques bouillis renforce le pouvoir virulent de doses subléthales de germes vivants à tel degré que les doses

inefficaces de ces derniers tuent l'animal d'essai comme la DLM normale. La quantité énorme de méningocoques libres dans le liquide céphalo-rachidien des lapins morts, montre de son côté que la virulence de germes s'exalte très fortement sous l'influence de l'endotoxine additionnée.

TABLEAU IV. — Influence de l'endotoxine
sur la virulence du méningocoque B-126.

NUMÉRO des lapins	POIDS	DOSE de la culture vivante en milliards	RÉSULTATS	NUMÉRO des lapins	POIDS	DOSE D'ESSAI en milliards		RÉSULTATS
						Culture vivante	Culture tuée à 100°C	
133	1.550	2	+ 15 h.	146	1.500		2	Vivant.
135	1.300	1	Vivant.	88	1.530	1	1	+ 14 h.
86	1.300	0,5	Vivant.	195	1.500	0,5	1,5	+ 10 h.
145	1.550	0,25	Vivant.	200	1.550	5,25	1,75	Vivant.

Le signe + indique la mort

Evidemment on pourrait interpréter ce phénomène par l'action des aggrésines de Bail. On pourrait même identifier l'endotoxine méningococcique avec l'aggrésine artificielle de Wassermann et Citron.

L'action pathogène des méningocoques est de nature complexe. Ce fait est important au point de vue pratique. Sans doute les sérums antiméningococciques thérapeutiques doivent être microbicides et en même temps suffisamment antitoxiques. Pour être efficaces ces sérums doivent paralyser, dans l'organisme infecté l'ensemble du pouvoir pathogène des méningocoques. Il est probable que les sérums « partiellement actifs », mettant en liberté les endotoxines sans les neutraliser, peuvent même aggraver la marche de la méningite cérébro-spinale, les endotoxines libérées, d'après ce que nous venons de voir, pouvant renforcer la virulence de méningocoques restés vivants. Nos observations sur l'aggravation marquée de la méningite expérimentale chez les lapins sous l'influence des sérums défec-tueux confirment, semble-t-il, cette possibilité (voir notre premier mémoire).

CONCLUSIONS.

1° Les recherches expérimentales sur la pathogénie de la méningite cérébro-spinale ont donné les résultats suivants. L'infection méningococcique par voie veineuse produit chez les lapins une septicémie bien nette. Cette septicémie primaire s'accompagne régulièrement de la pénétration des méningocoques dans la cavité sous-arachnoïdienne. Il peut en résulter des lésions méningées secondaires. Cependant les complications méningées ne se manifestent chez les lapins que très rarement, grâce à la résistance marquée des animaux vis-à-vis des méningocoques. Dans la plupart des cas, l'infection méningée reste inapparente chez ces animaux. L'infection méningée primaire produite par l'injection de méningocoques dans la cavité sous-arachnoïdienne provoque toujours chez les lapins une septicémie méningococcique secondaire. Cette dernière commence déjà quelques minutes après l'infection méningococcique sous-arachnoïdienne. De même, la méningite cérébro-spinale s'accompagne toujours d'infection méningococcique généralisée. En résumé, les recherches expérimentales confirment complètement la conception actuelle d'après laquelle la méningite cérébro-spinale chez l'homme est une complication secondaire de la septicémie méningococcique d'origine pharyngée.

2° L'étude expérimentale de l'action pathogène des méningocoques faite aux lapins a montré sa nature complexe. La propriété toxique et la propriété virulente constituent le pouvoir pathogène de ce microbe. Ces deux propriétés coexistent dans la culture pathogène. La culture peut perdre sa virulence en conservant ses propriétés toxiques. D'autre part le facteur toxique (l'endotoxine) peut exalter les propriétés virulentes des méningocoques, *in vivo*, montrant une fonction analogue aux agressines. La nature complexe du pouvoir pathogène présente un intérêt particulier pour la sérothérapie antiméningococcique : qui doit être antibactérienne et antitoxique. L'emploi des sérums « défectueux » peut aggraver l'infection méningococcique, en libérant des endotoxines ces sérums peuvent exalter la virulence de germes restés vivants. Il est donc indiqué d'immuniser les chevaux producteurs du sérum avec les cultures les plus pathogènes.

DEUXIEME PARTIE

Virulence des méningocoques pour le lapin
et sa conservation au laboratoire.

La reproduction de la méningite cérébro-spinale chez les lapins que nous avons réalisée peut avoir une double importance. En effet, elle nous permet d'étudier la méningococcie dans les conditions expérimentales du laboratoire. De plus, elle est intéressante pour l'appréciation *in vivo* de la valeur des sérums antiméningococciques. Cependant, cela n'est possible qu'à condition d'avoir toujours au laboratoire des souches méningococciques virulentes. Ce dernier point offre encore un intérêt pratique particulier, parce que l'emploi des cultures méningococciques pathogènes virulentes pour l'immunisation des chevaux représente évidemment une des conditions importantes de la production de sérums antiméningococciques actifs.

a) VIRULENCE CHEZ LE LAPIN DE CULTURES MÉNINGOCOCCQUES,
FRAÎCHEMENT ISOLÉES DE MALADES ET DE PORTEURS SAINS.

Nous avons commencé nos études de la virulence des méningocoques chez le lapin par des épreuves en masse des cultures fraîchement isolées du liquide céphalo-rachidien de malades atteints de méningite cérébro-spinale, ainsi que des souches obtenues des porteurs sains des méningocoques.

Les cultures méningococciques chez les malades ont été isolées sur milieu de Dorset, parfois après l'enrichissement préliminaire sur la peptone glucosée. Les germes ont été isolés, chez les porteurs, au moyen de culture sur gélose sérique préparée d'après M. Nicolle (gélose au sérum formolé). Les cultures de méningocoques ainsi obtenues ont été ensuite conservées sur le milieu de Dorset. Nous avons examiné la virulence des cultures en les injectant à la dose de 2 milliards de germes dans la cavité sous-arachnoïdienne de lapins pesant

1.500 à 1.600 grammes environ. Au total, 40 cultures ont été étudiées d'après cette méthode et parmi celles-ci, 32 souches isolées de malades, et 8 souches isolées de porteurs. Parmi les cultures examinées, 19 appartenaient au type A et 21 au type B.

Les résultats des épreuves exécutées furent, dans l'ensemble, les suivants : 35 cultures ont causé chez les lapins une méningite mortelle et 5 cultures ont provoqué une infection méningée, qui s'est terminée par la guérison. En outre, toutes les cultures isolées de porteurs se sont montrées virulentes pour les lapins (méningite mortelle).

Ainsi, les examens des cultures de méningocoques, fraîchement isolées et ensuite conservées sur le milieu de Dorset, ont montré une virulence régulière vis-à-vis des lapins, la méningite expérimentale mortelle a été provoquée par 35 cultures sur 40 examinées, c'est-à-dire dans 87,5 p. 100. Cependant, il faut noter que le degré de la virulence peut varier suivant la culture isolée. Par exemple, la durée de l'infection mortelle reproduite, oscillait de seize à vingt-quatre heures jusqu'à trois à six jours pour 32 souches isolées chez les malades. L'isolement de cultures méningococciques du liquide céphalo-rachidien des lapins morts a réussi dans 24 cas, c'est-à-dire dans 75 p. 100.

Nous avons l'impression que les méningocoques du type A sont plus virulents vis-à-vis des lapins, que les méningocoques du type B. Ainsi, parmi 17 cultures du type A, 16 souches ont causé une méningite mortelle (94 p. 100) avec, pour celle-ci, une durée moyenne égale à vingt heures. En même temps, parmi 15 cultures du type B, seules 11 souches ont provoqué une méningite mortelle (73 p. 100) avec une durée moyenne égale à quarante heures. Pourtant, la virulence relativement plus faible du type B peut être le résultat de sa labilité plus marquée en comparaison de celle du type A. On peut supposer que la virulence des méningocoques B s'affaiblit rapidement sur les milieux artificiels.

Il est très intéressant de noter que les cultures méningococciques isolées de porteurs sains manifestent aussi une virulence certaine vis-à-vis du lapin (d'après les recherches de notre collaborateur le Dr P. Pawloff). Cependant, le nombre limité

des observations ne permet pas encore d'établir de conclusions définitives à ce sujet (8 observations).

En résumé, nous pouvons affirmer que les cultures de méningocoques fraîchement isolées de malades atteints de méningite cérébro-spinale sont, en général, virulentes vis-à-vis des lapins si on les essaye par voie sous-arachnoïdienne.

REMARQUE. — Dans un but pratique, on peut recommander de faire la première inoculation au lapin, d'une souche fraîchement isolée à dose double (4 milliards). Cela permet d'obtenir plus sûrement la première culture de passage.

b) INFLUENCE DES MILIEUX DE CULTURE SUR LA VIRULENCE
DES MÉNINGOCOQUES.

L'importance du milieu pour la conservation de la virulence des méningocoques vis-à-vis de la souris a été démontrée récemment par Murray (1929). Nous avons étudié ce problème par rapport au lapin. Trois milieux ont été examinés dans ce but dans les conditions comparables d'essais : le milieu de Dorset, le sérum coagulé de Löffler et la gélose de Beily. La méthode des examens a été la suivante : le liquide céphalo-rachidien des lapins morts de méningite expérimentale a été ensemencé parallèlement sur les différents milieux d'essais. Les cultures obtenues ont été conservées sur les mêmes milieux, dans l'étuve, pendant quatre à dix jours. Ensuite, de nouvelles cultures ont été faites et on les a éprouvées sur les lapins par la voie sous-arachnoïdienne. Voici, dans le tableau n°5, quelques protocoles qu'illustrent les résultats obtenus.

Nous voyons ainsi que le milieu nutritif est un facteur très important pour la conservation de la virulence des méningocoques. L'emploi d'un milieu qui ne convient pas peut affaiblir ou même anéantir très rapidement la virulence des méningocoques. Par exemple, la conservation des méningocoques sur le sérum coagulé de Löffler pendant quarante cinq jours a suffi, dans certains cas, pour enlever à la culture une grande partie de sa virulence.

En résumé, nos expériences ont montré que le milieu de Dorset, recommandé par Murray, conserve la virulence des

TABLEAU V. — Influence des milieux sur la virulence des méningocoques.

CULTURE d'essai	MILIEU d'essai (d'après l'auteur)	DURÉE de la conservation en jours	ÉPREUVE DE LA VIRULENCE			
			Numéro des lapins	Poids	Dose d'essai en milliards de germes	Résultats
133	Dorset.	4	185	1.250	2	+ 16-18 h.
	Löffler.	4	183	1.250	2	Vivant.
185	Dorset.	5	116	1.400	2	+ 13 h.
	Löffler.	5	113	1.400	2	Vivant.
93	Dorset.	10	124	1.250	2	+ 9 h.
	Löffler.	10	123	1.200	2	+ 19 h.
	Beily.	10	122	1.200	2	Vivant.

Le signe + indique la mort.

méningocoques de la façon la plus satisfaisante. Au contraire, le sérum coagulé de Löffler et aussi la gélose de Beily donnent des résultats moins favorables.

c) INFLUENCE SUR LA VIRULENCE DES MÉNINGOCOQUES
DE LA CONSERVATION PROLONGÉE SUR MILIEU DE DORSET.

D'après Murray, par repiquages en série, sur le milieu de Dorset tous les dix à quatorze jours, les cultures de méningocoques conservent complètement leur virulence vis-à-vis des souris. Au contraire, les repiquages sur le même milieu, mais avec les intervalles plus longs, affaiblissent la virulence des cultures.

En général, nous avons confirmé les données de Murray aussi par rapport aux lapins. Par exemple, notre culture B-126, conservée sur le milieu de Dorset par repiquages avec les intervalles égaux à dix à quatorze jours, a montré une virulence non modifiée par l'épreuve sous-arachnoidienne faite au lapin, après six mois et demi. Tandis que la même culture a manifesté un pouvoir virulent inconstant, quand elle était conservée sur le milieu de Dorset sans repiquages pendant vingt et un à vingt-quatre jours.

Cependant, d'après nos recherches, la méthode de Murray

n'est pas sûre pour la conservation des cultures virulentes des méningocoques. Nous avons observé que les cultures conservées d'après Murray perdent leur virulence vis-à-vis des lapins. D'un autre côté, nous avons parfois constaté la perte totale de virulence de nos cultures, malgré leur repiquage à intervalles égaux de cinq à dix jours. Nous n'avons pas réussi à reproduire régulièrement ces faits qui étaient toujours spontanés. Mais on peut leur trouver une explication. Les cultures méningococciques sur le milieu de Dorset présentent souvent un degré d'autolyse marqué. Ce phénomène caractéristique pour les méningocoques en général peut, évidemment, influencer défavorablement la vitalité et la virulence de ces microbes délicats. Il est très probable que les échecs de la méthode de Murray sont liés à ce phénomène de l'autolyse. En outre, d'après nos observations, la vitalité des cultures des méningocoques sur le milieu de Dorset est assez limitée et ne dépasse pas quatre semaines environ (dans les tubes d'essai scellés).

d) CONSERVATION DES MÉNINGOCOQUES VIRULENTS
DANS LES CULTURES SUR MILIEU A L'ŒUF.

On sait que les méningocoques peuvent conserver leur vitalité, dans les cultures anaérobies, pendant plusieurs mois. Il y a aussi des observations, d'après lesquelles les cultures méningococciques conservent très bien leur virulence dans les conditions d'anaérobiose. Kolle et Hetsch, par exemple, recommandent d'ensemencer les méningocoques dans le sérum de lapin chauffé (56° C.), en recouvrant les cultures avec de l'huile de paraffine; les cultures restent virulentes durant une année et plus. Murray propose une gélose spéciale (« F »); les cultures conservées sur ce milieu sous la couche de paraffine liquide restent virulentes de cinq à quatorze mois.

Nous avons essayé la conservation de la virulence des méningocoques dans les cultures anaérobies. Parce que le milieu de Dorset, milieu à l'œuf coagulé, conserve assez bien la virulence des méningocoques, il nous a semblé raisonnable d'utiliser, pour les cultures anaérobies, le milieu préparé aussi avec des œufs, mais non coagulés. Nous avons établi la technique suivante :

On prépare des œufs comme pour le milieu de Dorset, c'est-à-dire qu'on mélange soigneusement, dans les conditions aseptiques, le contenu des œufs avec la solution de Ringer (10 cent. cubes de solution de Ringer pour chaque œuf). On verse le milieu semi-liquide obtenu dans les tubes à essai stérilisés. Ensuite, on chauffe les tubes à essai avec le milieu qu'ils contiennent à 60° C. environ pendant trente minutes trois jours de suite. Puis on place le milieu à l'étuve pour le contrôle de sa stérilité. Après trois jours de contrôle, on obtient ainsi le milieu à l'œuf, liquide ou semi-liquide, prêt pour les ensemencements des cultures.

Sur ce milieu à l'œuf ci-dessus décrit, nous avons ensemencé nos cultures d'essai. On a placé ensuite les tubes ensemencés dans l'étuve, et au troisième jour on y a ajouté quelques centimètres cubes de paraffine liquide. On a ainsi conservé les cultures anaérobies dans l'étuve.

TABLEAU VI. — Conservation de la virulence des méningocoques dans les cultures anaérobies.

CULTURE d'essai	ÉPREUVE DE LA VIRULENCE APRÈS						
	0	1/2 mois	1 mois	1 m. 1/2	2 mois	2 m. 1/2	3 mois
B-126	† 18 h.		† 20 h.	† 12 h.	† 16 h.		Vivant.
B-143			† 23 h.		† 12 h.	† 14 h.	
B-188			† 16 h.		† 18 h.	Vivant.	
B-187			† 17 h.		Vivant.		
A-153	† 10 h.	† 12 h.	† 17 h.	† 16 h.	† 12 h.	La sous culture ne réussit pas.	
A-185			† 12 h.			Vivant.	
A-181			† 16 h.			Vivant.	

Le signe † indique la mort.

Pour contrôler la virulence, on fait des ensemencements sur milieu de Dorset, en employant pour l'injection des lapins la deuxième génération.

Nous avons examiné d'après cette méthode toute une collection de cultures méningococciques. Les résultats obtenus peuvent être résumés de la façon suivante :

Les méningocoques conservent leur vitalité en culture anaérobie sur le milieu liquide à l'œuf durant deux à trois mois.

Quant à la virulence, elle se conserve parfaitement dans les cultures âgées d'un mois et d'un mois et demi. Dès le deuxième mois, l'affaiblissement de la virulence peut déjà se manifester. Après deux mois et demi, les cultures perdent leur virulence dans la plupart des cas.

Le tableau n° VI illustre les faits que nous venons d'exposer.

Nous voyons ainsi que la conservation des méningocoques dans les cultures anaérobies en milieu liquide à l'œuf donne des résultats pratiques tout à fait satisfaisants. Les souches restent bien virulentes dans ces cultures pendant un mois ou un mois et demi. En réensemencant chaque mois les souches dans les conditions anaérobies, on peut conserver leur virulence plus sûrement que par les repiquages sur le milieu de Dorset, d'après la méthode de Murray.

e) RÉACTIVATION DE LA VIRULENCE ATTÉNUÉE DES MÉNINGOCOQUES.

Peut-on réactiver la virulence déjà affaiblie des méningocoques? Nous avons étudié cette question importante.

La régération de la virulence affaiblie des souches méningococciques est possible assez souvent, si les cultures ne sont pas trop dégradées. On y réussit en particulier par les passages sous-arachnoïdiens faits sur des lapins avec des souches affaiblies aux doses augmentées. Voici un exemple (voir le tableau VII).

Comme on peut le voir par ce tableau, la culture atténuée A-168 n'était pas capable de tuer le lapin à la dose de 2 milliards de germes. La même culture après deux réinoculations aux lapins aux doses doubles (4 milliards) a renforcé sa virulence et tué le lapin d'une façon régulière, en provoquant, chez lui, la méningite aiguë.

Le tableau VII montre aussi des propriétés très caractéristiques du liquide céphalo-rachidien. Dans le cas d'une virulence élevée, on rencontre dans le liquide céphalo-rachidien une grande quantité de méningocoques à côté de leucocytes isolés. Cette proportion entre les méningocoques et les leucocytes devient inverse dans le cas d'affaiblissement de la virulence. Donc, en ce qui concerne la virulence de la culture, on peut tirer des conclusions de l'examen microscopique du liquide céphalo-rachidien.

TABLEAU VII. — Régénération de la virulence de la culture A-168.

NUMÉRO D'ESSAI	NUMÉRO DES LAPINS	POIDS DES LAPINS	DATE de l'essai	CULTURE DE PASSAGE	DOSE D'ESSAI en milliards	RÉSULTATS	LIQUIDE céphalo-rachidien	
							Leucocytes	Méningocoques
1	64	1.550	21 octobre.	168	2	Vivant.		
2	95	1.600	1 ^{er} novembre.		4	+ 11 h.	+++	+
3	100	1.300	3 novembre.	95	4	+ 20 h.	++	+++
4	31	1.350	6 novembre.	100	2	+ 15 h.	+	+++
5	32	1.700	8 novembre.	31	2	+ 50 h.	++	+++
6	130	1.550	12 novembre.	32	2	+ 12 h.	+	+++
7	192	1.300	12 novembre.	130	2	+ 18 h.	+	+++
8	197	1.700	1 ^{er} décembre.	192	2	+ 18 h.	+	+++
9	55	1.350	12 décembre.	197	2	+ 18 h.	+	+++

Les signes indiquent : + rares, ++ quantité modérée, +++ très nombreux, † mort.

TABLEAU VIII. — Réactivation de la virulence de la culture B-126.

NUMÉRO D'EXPÉRIENCE	NUMÉRO DES LAPINS	POIDS DES LAPINS	DATE D'EXPÉRIENCE	CULTURE DE PASSAGE	DOSE D'ESSAI en milliards	RÉSULTATS	TABLEAU microscopique de liquide céphalo-rachidien	
							Leucocytes	Méningocoques
1	74	1.400	30 janvier	47	2	+ 3 j.	+++	+
2	81	1.300	3 février.	74	1	+ 4 j.	+++	0
3	90	1.400	7 février.	81	2	+ 10 h.	+	+++
4	93	1.550	9 février.	90	2 × 109°C	+ 20 h.	+	+++
5	123	1.200	20 février.	93	2	+ 49 h.	+	+++
6	117	1.500	21 février.	123	2	+ 10 h.	+	+++
7	10	1.500	27 février.	117	2	+ 18 h.	+	+++

Les signes indiquent : 0 absence, + uniques, ++ quantité modérée, +++ très nombreux, † mort.

La culture affaiblie des méningocoques peut être régénérée aussi par réinoculation aux lapins à la dose ordinaire, mais renforcée par l'addition d'une quantité suffisante d'endotoxine de

la même culture (émulsion méningococcique stérilisée à 100° C pendant une minute). Le tableau VIII représente un exemple de cette régénération de la virulence.

Le tableau VIII montre très nettement l'exaltation rapide de la virulence de culture sous l'influence de l'addition d'endotoxine. Les relations caractéristiques entre la virulence et le contenu microscopique du liquide apparaissent clairement d'après ce protocole.

Les méthodes de réactivation des souches atténuées, quoique en général efficaces, ne sont pas sûres. Elles deviennent inefficaces quand la dégradation de la culture est trop grande. Néanmoins, nous mettons toujours en œuvre ces méthodes lorsque nous nous trouvons en présence de souches affaiblies. Nous pouvons ainsi, assez souvent, régénérer la virulence de ces cultures. Il nous paraît rationnel d'utiliser ces méthodes quand la souche commence à manifester de l'atténuation. L'examen microscopique du liquide céphalo-rachidien des lapins morts de méningite expérimentale permet, nous l'avons vu, de prévoir sûrement un tel affaiblissement (voir plus haut).

f) INFLUENCE DES PASSAGES EN SÉRIE CHEZ LE LAPIN SUR LA VIRULENCE DES MÉNINGOCOQUES.

Nous avons étudié en détail l'influence sur la virulence de passages en série chez le lapin.

Comme nous avons déjà vu, les passages « renforcés », faits en série aux lapins, peuvent régénérer assez souvent, mais pas toujours, la virulence atténuée des méningocoques. C'est le premier fait qui doit être noté à propos des passages.

Peut-on diminuer à l'aide des passages successifs la dose minima mortelle des souches virulentes? Nos expériences donnent à ce sujet une réponse négative. Si, par exemple, la dose sûrement mortelle d'une culture est égale à 2 milliards de germes, les doses moindres de la même souche peuvent être capables aussi de tuer le lapin par méningite. Cependant, les résultats des essais ne sont pas réguliers.

Est-il possible de conserver la virulence des cultures de méningocoques par les passages en série chez le lapin? Les nombreuses recherches que nous avons exécutées montrent

que la méthode des passages intra-rachidiens successifs, pour la conservation de la virulence des méningocoques, n'est pas sûre. Durant les passages, la virulence des méningocoques peut s'affaiblir spontanément, malgré toutes les précautions prises par l'expérimentateur. Les cultures affaiblies peuvent être régénérées par réinoculations « renforcées » d'après la méthode décrite plus haut. Mais, parfois, la dégradation spontanée peut atteindre un tel degré que tous les efforts de régénération restent sans succès.

Ainsi, nous avons fait, avec notre culture-étalon très virulente B-126, 21 passages successifs aux lapins durant quatre mois (28 octobre 1931 au 27 février 1932). Nous avons réinoculé la culture par voie intrarachidienne à des intervalles de deux-trois à dix jours, en employant toujours la même dose sûrement mortelle (2 milliards). Entre les réinoculations, la culture a été conservée sur le milieu de Dorset. Notre culture a montré deux fois un affaiblissement spontané bien net pendant ces expériences; c'était au onzième et au quinzième passage. Cependant, nous réussîmes, dans ces cas, à réactiver complètement la virulence atténuée de la souche.

Parallèlement, nous avons étudié dans les mêmes conditions expérimentales une autre culture-étalon A-168. Nous avons fait avec cette culture 22 passages du 21 octobre 1931 au 10 mars 1932. La culture resta bien virulente jusqu'au dixième passage (31 décembre). Ensuite, un affaiblissement progressif s'est manifesté. La régénération entreprise a renforcé partiellement la culture, mais au dix-septième passage (21 février) la culture a cessé de tuer les lapins. Tous les essais ultérieurs de renforcement de la virulence (4 réinoculations successives avec l'endotoxine) restèrent sans résultats. Nous avons là un bon exemple d'épuisement irréversible de la virulence de la culture méningococcique qui s'est manifestée pendant les passages en série.

Nous voyons donc que la méthode de passages successifs aux lapins peut être utilisée seulement dans le but de régénérer la virulence des cultures de méningocoques partiellement affaiblies.

g) REMARQUES GÉNÉRALES SUR LA VIRULENCE ET L'ACTION PATHOGÈNE
DES MÉNINGOCOQUES VIS-A-VIS DU LAPIN.

Nous avons déjà noté que la toxicité et la virulence sont les deux facteurs du pouvoir pathogène des méningocoques. L'action pathogène des méningocoques se caractérise donc par sa nature complexe.

Il est à remarquer que l'on ne réussit pas à diminuer la dose minima mortelle des méningocoques par la méthode de renforcement de la virulence. Cependant, les méthodes des passages successifs possèdent une certaine efficacité, puisqu'elles permettent d'augmenter la virulence des souches affaiblies.

En résumé, la dose minima sûrement mortelle se montre plus ou moins constante pour chaque culture pathogène. On peut la conserver, mais on ne réussit pas à la diminuer d'une façon marquée.

On pourrait déduire de cela, que l'action pathogène des méningocoques vis-à-vis des lapins est simplement toxique. Une telle conclusion manquerait de précision. Nous avons vu en effet que les lapins supportent bien l'intoxication avec des doses doubles des méningocoques tués ou non virulents. De plus, on observe toujours une quantité énorme de méningocoques libres dans le liquide céphalo-rachidien des lapins infectés avec les souches très virulentes. Au contraire, les essais avec les souches peu virulentes se caractérisent par un liquide purulent avec les germes rares phagocytés. La méningite cérébro-spinale expérimentale des lapins représente donc une vraie infection méningée méningococcique.

Analysons maintenant une autre suite de faits expérimentaux. Nous avons vu que l'injection intrarachidienne de l'endotoxine méningococcique provoque chez les lapins des symptômes bien caractérisés, tout à fait analogues aux symptômes initiaux de l'infection méningée mortelle. D'autre part, nous avons constaté, que l'addition de l'endotoxine spécifique à une dose inefficace d'une souche virulente reproduit chez les lapins traités par voie intra-rachidienne une méningite mortelle aiguë avec culture abondante dans la cavité sous-arachnoïdienne.

Cet exposé montre ainsi l'importance indiscutable de l'endo-

toxine pour l'origine de l'infection méningée méningococcique des lapins. Il faut même conclure que l'intoxication préliminaire avec l'endotoxine est indispensable pour l'infection méningée. Cette intoxication représente évidemment la première étape de l'action pathogène des méningocoques introduits dans la cavité sous-arachnoïdienne des lapins. Voilà pourquoi les symptômes initiaux de l'infection méningée sont identiques à ceux qui évoluent après l'intoxication simple.

L'infection méningée proprement dite se développe donc à la deuxième étape. Evidemment, il faut aussi que l'intoxication préliminaire soit suffisante. Le pouvoir envahissant des méningocoques est faible. Les germes envahissent les tissus dont la résistance est préalablement affaiblie par l'endotoxine libérée. L'infection méningococcique se développe ainsi avec l'appui de l'endotoxine qui présente ainsi les propriétés de l'aggressine.

En résumé, nous voyons que la dose de méningocoques sûrement mortelle par voie sous-arachnoïdienne doit être fortement infectante et en même temps suffisamment toxique. Mais pour être suffisamment toxique, elle doit être assez massive, parce que l'action toxique de l'endotoxine est proportionnelle à la quantité des germes. Ces faits nous expliquent pourquoi les doses sûrement mortelles pour les lapins sont assez fortes en général, elles oscillent entre 1 à 2 milliards de germes). D'un autre côté, les mêmes faits nous montrent pourquoi les doses mortelles restent plus ou moins stables pour chaque souche méningococcique, et ne peuvent diminuer sous l'influence des méthodes renforçantes (passages en série).

Malgré toutes ces particularités, la dose sûrement mortelle des méningocoques vis-à-vis des lapins peut être bien caractérisée. C'est la dose minima de germes qui, introduite par voie sous-arachnoïdienne, reproduit régulièrement la méningite chez les lapins de 1.500 grammes environ, en les tuant au bout de douze jours, avec présence de nombreux méningocoques libres dans le liquide céphalo-rachidien.

CONCLUSIONS.

Les faits présentés dans ce chapitre nous permettent de tirer quelques conclusions générales à propos de la virulence

des méningocoques et de sa conservation au laboratoire.

Nous appuyant sur des observations assez nombreuses, nous pouvons affirmer que les souches de méningocoques A et B, fraîchement isolées de malades atteints de méningite et non atténuées par des passages sur des milieux non appropriés, sont capables de reproduire chez les lapins la méningite mortelle lorsqu'elles sont administrées, par voie sous-arachnoïdienne, à la dose de 2 milliards de germes (examen de 32 cultures). Les cultures isolées de porteurs sains manifestent aussi une virulence suffisante vis-à-vis des lapins (l'examen de 8 cultures avec les résultats positifs). Par rapport aux 40 cultures examinées, une virulence bien nette a été trouvée chez 87,5 p. 100 d'entre elles.

Les cultures méningococciques bien virulentes peuvent perdre très facilement leur pouvoir pathogène pour le lapin si on les ensemence sur un milieu non approprié (sérum coagulé, gélose de Beily). Les recherches comparatives montrent que les cultures de méningocoques sur le milieu de Dorset conservent assez bien leur virulence. Ce milieu donc, quoique qu'il ne soit pas parfait, est préférable pour la pratique courante.

Les réensemencements successifs sur le milieu de Dorset, faits à des intervalles ne dépassant pas dix-quatorze jours, peuvent conserver la virulence des méningocoques, durant plusieurs mois. Cependant, cette méthode proposée par Murray n'est pas sûre. Parfois en effet les souches méningococciques cultivées d'après cette méthode perdent leur virulence et même leur vitalité. Il est probable que de tels échecs dépendent de l'autolyse qui se produit souvent dans ces cultures.

Nous avons examiné la conservation des souches méningococciques virulentes dans les cultures anaérobies faites en milieu liquide préparé avec des œufs (la modification du milieu de Dorset) et sous une couche d'huile de paraffine liquide. Cette méthode nous a donné des résultats très satisfaisants. Les cultures préparées de cette manière restent vivantes à l'étuve pendant deux-trois mois en conservant leur pouvoir pathogène pour les lapins pendant un mois ou un mois et demi. La méthode des cultures anaérobies semble-t-il, peut résoudre le problème de la conservation des souches méningococciques virulentes, de la façon la plus sûre et la plus pratique.

Les cultures de méningocoques partiellement atténuées peuvent assez souvent être réactivées au moyen de passages par voie intra-rachidienne, faits sur le lapin avec les doses de germes augmentées ou renforcées par l'addition d'endotoxine homologue (l'émulsion méningococcique chauffée à 100°C). La méthode est particulièrement pratique pour le renforcement des cultures qui commencent à s'affaiblir (régénération préventive). La diminution ou la disparition des méningocoques libres et l'augmentation proportionnelle des leucocytes dans le liquide céphalo-rachidien des lapins morts de méningite expérimentale, constitue un indice précis de l'atténuation initiale. Par rapport aux cultures fortement dégradées, la méthode de passage est inefficace.

Les passages par voie sous-arachnoïdienne faits en série chez le lapin avec les ensemencements intermédiaires de germes sur le milieu de Dorset ne conservent pas sûrement la virulence des méningocoques. Celle-ci peut diminuer ou même disparaître pendant ces passages.

La dose sûrement mortelle des méningocoques virulents vis-à-vis des lapins de 4.500 grammes environ oscille en moyenne entre 1 et 2 milliards de germes. On ne réussit pas à la diminuer d'une manière marquée par les méthodes qui servent pour le renforcement de la virulence, par exemple au moyen des passages successifs. Cette particularité s'explique par la nature complexe du pouvoir pathogène des méningocoques (intoxication, envahissement microbien) d'une part, et par la résistance relative des lapins vis-à-vis des méningocoques d'autre part.

La virulence (ou le pouvoir envahissant) du méningocoque est relativement faible. De plus, la résistance des lapins contre l'infection méningée méningococcique est assez grande. L'infection peut s'installer grâce à un fléchissement suffisant de la résistance des tissus par l'intoxication. L'infection méningée se développe à la faveur de l'endotoxine libérée par les germes introduits et lysés. L'intoxication doit être assez forte, afin que les germes vivants puissent envahir les tissus. Pour cela, la quantité d'endotoxine, c'est-à-dire de germes lysés, doit être considérable. Il en résulte que la dose sûrement mortelle doit être considérable. On peut remplacer une partie des germes

vivants par une quantité équivalente de microbes tués. Dans ce cas, la dose de germes vivants, inefficace par elle-même, devient capable de reproduire la méningite mortelle. Tous ces faits expliquent, semble-t-il, la constance relative de la dose sûrement mortelle et la nécessité d'utiliser une dose de germes relativement forte.

En résumé, nos essais montrent que l'emploi de cultures virulentes de méningocoques dans la pratique courante du laboratoire, est possible, malgré les quelques difficultés qui peuvent se rencontrer. La réalisation de la méningite cérébro-spinale expérimentale chez le lapin permet ainsi nombre de recherches d'ordre théorique et pratique.

ÉTUDE SUR LES PROPRIÉTÉS FERMENTATIVES DES SARCINES

par JAN SMIT.

(*Laboratoire de Microbiologie générale
de l'Université d'Amsterdam.*)

INTRODUCTION.

Les fermentations gastriques, causées par des sarcines, sont connues depuis 1842, époque où le médecin anglais, John Goodsir [1] décrivit pour la première fois les organismes qui les produisent. Après lui, nombre d'auteurs ont fait des études sur le même sujet, sans parvenir cependant à cultiver ces microbes à l'état de pureté, ne réussissant pas même à en stimuler la multiplication dans le suc gastrique (stérilisé ou non) ou dans d'autres milieux de culture. C'est pourquoi on a maintes fois émis des doutes sur la question de savoir si les sarcines visibles dans le suc des malades, étaient vraiment responsables de la maladie. Ce ne fut qu'en 1911, quand Beijerinck parvint à les cultiver à l'état pur, que ces doutes s'évanouirent.

Il paraît tout naturel qu'autrefois nombre d'auteurs aient affirmé que les sarcines gastriques n'étaient pas cultivables. D'autres cependant désignaient sous le nom de *Sarcina ventriculi* toutes sortes de sarcines aérobies, facilement cultivables, isolées du contenu stomacal, sans apporter ni exiger de preuves que ces organismes appartenaient en effet à cette espèce. Par conséquent, la littérature concernant ce sujet est encombrée de faits et de descriptions relatives à des *Sarcina ventriculi* qui n'ont rien de commun avec celle de Goodsir. Un bref résumé historique permettra de s'en rendre compte.

(1) Une image admirable du contenu stomacal contenant des sarcines se trouve dans l'ouvrage de Hassal, Lancet, vol. LXIV, 1853, p. 366.

HISTORIQUE.

La découverte de Goodsir fut suivie de nombreuses recherches ayant un but casuistique ou thérapeutique donnant l'impression que le lien de cause à effet entre les sarcines et la fermentation gastrique était fortement contesté. Ainsi Virchow [2] note que « la sarcine n'a aucune relation avec la fermentation ni avec aucun processus pathologique ». Et Hasse [3], ne pouvant cultiver l'organisme en dehors de l'estomac, dans le lait, la pâte de farine, ou les solutions de sucre, doute que la sarcine soit « la seule ou la principale cause de la maladie (dyspepsie avec vomissements) », mais il indique que les symptômes diminuent ou même disparaissent, à mesure que le nombre des sarcines décroît, soit spontanément, soit par l'effet de médicaments (nitrate d'argent, selon Hasse, créosote ou acide cyanhydrique, selon Goodsir), sans guérir complètement la maladie.

La première étude approfondie de l'organisme lui-même a été faite par W. F. R. Suringar, professeur à Leyde (1865) [4] qui, ne réussissant pas, lui non plus, à obtenir le microbe en culture pure, basa ses recherches morphologiques sur l'examen des constituants du suc gastrique d'un malade, et réussit à élucider les lois de sa multiplication par des observations méthodiques, montrant que la scission des cellules coccoï les dont sont formées les sarcines a lieu dans les trois directions perpendiculaires de l'espace, l'une après l'autre, de sorte qu'elles prennent l'aspect de paquets cubiques de formes irrégulières. En outre, il réussit à établir que la membrane de la cellule contient de la cellulose. Il utilisait pour cette démonstration le réactif de Schultze (solution concentrée de chlorure de zinc, additionnée d'iode), après avoir traité les sarcines par l'acide nitrique ou la soude caustique. Par ce moyen put être affirmée pour la première fois la nature végétale de l'organisme, contrairement à ce qu'admettaient Virchow et Müller. Ses admirables dessins en couleur ne laissent plus aucun doute à ce sujet.

Le classement des sarcines dans la famille des coccacées a été rendu difficile parce qu'on y a fait entrer nombre de micro-organismes dont le développement suivant les trois dimensions de l'espace est discutable (l'algue *merismopedia*, les *pediococées*

par exemple) et ensuite parce que tous les organismes qui ont la forme de sarcines étaient réunis dans le seul genre *Sarcina*, sans tenir compte de leurs différentes origines (estomac, urine, bière, etc.) et de leurs qualités propres; de sorte qu'ultérieurement les auteurs qui les ont étudiées ont donné le nom générique de *Sarcina* à maintes espèces microbiennes ressemblant, il est vrai, à la sarcine de Goodsir du point de vue morphologique, mais en réalité très différentes de celle-ci.

Parmi ces auteurs, il faut citer d'abord Falkenheim [5] qui a créé beaucoup de confusion à cet égard. Employant du suc gastrique qui contenait des sarcines, il cultivait sur bouillon gélatiné divers cocci qui acquièrent la faculté de former des paquets sarcinoïdes quand ils se développent dans une infusion de foin. Leur multiplication abondante, leurs dimensions et l'absence de toute fermentation les distinguent clairement de *Sarcina ventriculi* de Goodsir, mais néanmoins Falkenheim identifie ses organismes avec celle-ci et, ce faisant, il commet une erreur qui se répercute dans la littérature jusqu'en 1921 (Heissen) [16], méconnaissant les données précises qu'avait fournies Beijerinck, dès 1911. Les travaux de Oppler [6], Gruber [7] et Coyon [8] répètent les erreurs de Falkenheim et revêtent du nom de *Sarcina ventriculi* toutes sortes de sarcines aérobies, qui n'ont aucune ressemblance avec le microbe de Goodsir. Il est déconcertant de constater que Stubenrath [9], ainsi que Lehmann et Neumann [10] en 1897, nient tout simplement l'existence d'un tel organisme, parce qu'on réussit facilement à isoler du suc gastrique un grand nombre de sarcines, aucune de celles-ci ne correspondant à la description de Goodsir.

Parmi les auteurs qui ont fait preuve d'une compréhension plus correcte de la question, il faut mentionner les noms d'Ehret [11] et de Latzel [12]; le premier faisant l'étude des produits de fermentation dans l'estomac malade (alcool éthylique, aldéhyde, acides acétique, formique et carbonique) sans réussir mieux que Latzel à cultiver l'organisme en question.

Les travaux fondamentaux relatifs à la morphologie et à la biologie de la sarcine de Goodsir sont ceux de Beijerinck. Dès ses premières recherches [13] en 1903, ce savant décrivait une méthode de culture de l'organisme de la terre arable, en

employant du moût d'orge assez acidifié avec l'acide chlorhydrique ou phosphorique pour qu'il soit devenu inapte au développement de tout autre microbe sauf la sarcine (10-12 cent. cubes d'acide phosphorique ou 6-8 cent. cubes d'acide chlorhydrique normal pour 100 cent. cubes de moût). Quand on remplit complètement un flacon bouché de 50 cent. cubes, contenant 2 ou 3 grammes de terre, avec ce liquide, et qu'on le porte à l'étuve à 35-37°C, une fermentation se manifeste après douze à seize heures et celle-ci augmente, de sorte qu'après vingt-quatre heures toute la masse se trouve en pleine fermentation et expulse le bouchon pendant qu'une écume épaisse couvre le liquide. Quand on examine au microscope un peu du dépôt terreux, on le voit mêlé à une multitude de sarcines en paquets de grandes dimensions (fig. 1) ressemblant en tous points à ceux qu'on trouve dans l'estomac.

Quand un volume convenable (environ 1 cent. cube) du dépôt est reporté dans un autre flacon contenant le même liquide que précédemment la fermentation se poursuit en série, le dépôt se purifiant à chaque passage de plus en plus, jusqu'à devenir blanc et sableux. On voit alors au microscope des paquets énormes (fig. 2). Le fait a été établi par Beijerinck, que ces transplantations ne peuvent être effectuées que pendant le temps où le liquide se trouve en fermentation, tandis qu'elles échouent si on les fait après que la fermentation a cessé (quarante-huit à soixante heures après le début). Le suc gastrique, obtenu de l'estomac d'un sujet porteur de sarcines, ne donna aucune culture, de sorte qu'il ne fut alors pas possible de prouver l'identité de la sarcine du sol avec *Sarcina ventriculi*. Cette identification ne put être réalisée qu'à la fin de 1911 [14] par l'introduction directe du suc gastrique dans un flacon contenant le moût acide à la température du corps. Dans ces conditions, la fermentation se produisit exactement comme avec la terre arable et les sarcines étaient identiques dans les deux cas. La multiplication est rigoureusement limitée aux conditions d'anaérobiose et à la présence de sucres (dextrose, lévulose, maltose ou sucrose) et de peptones, telles qu'on les trouve dans les préparations commerciales ou dans le moût et dans l'eau de levure.

Ces faits montrent clairement la cause des insuccès, dans les essais de culture de ces organismes, des recherches antérieures :

l'usage de matériel inadéquat, par exemple trop vieux, et un milieu sans sucre et insuffisamment acide, de telle sorte que d'autres organismes gênaient le développement des sarcines. Dans les cas cependant où un abondant développement aérobie de *Sarcina ventriculi* a été indiqué, avec perte des propriétés fermentatives (Falkenheim, Stubenrath, etc.), on peut être assuré qu'on était en présence de ces sarcines aérobies, qu'on trouve dans l'air, et dans la poussière et qu'on peut donc s'attendre à trouver aussi dans l'estomac.

Les publications subséquentes ne nous informent que des tentatives vaines effectuées pour cultiver les sarcines du suc gastrique (Latzel [12], Gerhard [15], Heissen [16]). Ces auteurs étaient manifestement ignorants des recherches heureuses de Beijerinck, et c'est ainsi que, dans la dernière édition du livre bien connu de Boas [17], sont seuls rapportés les résultats des investigations des auteurs allemands mentionnés ci-dessus.

Ce court aperçu historique montre que ce que nous savons de cette remarquable sarcine de l'estomac est presque limité aux observations cliniques et qu'une grande partie de la littérature sur les sarcines s'adresse à tort aux sarcines aérobies, de sorte qu'elle est sans valeur pour l'étude de l'organisme décrit par Goodsir. Seuls, les travaux des deux auteurs hollandais. Suringar et Beijerinck ont contribué à nous faire connaître sa morphologie et sa biologie. C'est parce que cette sarcine de l'estomac est encore loin d'être suffisamment étudiée qu'il m'a semblé utile d'essayer de combler les lacunes restantes en continuant les recherches de Beijerinck.

C'est aussi le cas pour un autre type de fermentation sarcinaire, vu pour la première fois par Lindner [18] dans les pâtes de farines en acidification spontanée, surtout quand il s'agit d'une fermentation butyrique. Dans ces cas, on rencontre des sarcines très volumineuses qui ressemblent à la *Sarcina ventriculi* comme forme et comme dimension. Ce même organisme a été décrit par Henneberg [19]. Lindner l'appela *Sarcina maxima*, mais, d'après une communication particulière du professeur Lindner, elle n'a pu être isolée en culture pure et on n'en connaît ni la biologie, ni l'identité possible avec la *Sarcina ventriculi*. On peut dire la même chose de la *Sarcina paludosa*, décrite par Schröter [20] mentionnée ultérieurement par quelques

auteurs (Wilhelmi [21], Kolkwitz [22] etc.), et qui se trouve dans la boue de rivières polluées ou des conduites d'eaux ménagères.

Un dernier groupe de sarcines-ferments est celui de la fermentation méthanique, décrit par Söhnngen [23]. Quoique la production de méthane et d'acide carbonique, à partir des sels d'acides gras, ait été étudiée soigneusement par cet auteur, l'isolement de la sarcine ne réussit pas, malgré maintes tentatives.

Il semble indiqué de comprendre ces sarcines, qui toutes sont rigoureusement anaérobies et dont le métabolisme se borne à des processus de fermentation, dans un groupe nouveau, bien à part des sarcines ordinaires et aérobies, qui sont dans l'impossibilité de vivre sans oxygène et par là montrent une relation intime avec les staphylocoques communs. Ce groupe pourrait raisonnablement être appelé *Zymosarcina* contenant les espèces : *Zymos. ventriculi* (Goodsir), *Zymos. maxima* (Lindner), *Zymos. methanica* (Söhnngen).

Nous laissons ici hors de discussion les sarcines qui déterminent une maladie de la bière et qui ont été décrites par Lindner dans sa monographie de 1888. La connaissance de ces organismes est encore loin d'être complète, malgré les études de Henneberg et d'autres auteurs. Elles ne sont pas ferments, elles sont anaérobies facultatives, et semblent être liées aux bactéries de la fermentation lactique. Ces sarcines méritent que leur étude soit reprise et mise au point.

Zymosarcina ventriculi (Goodsir). — Son habitat normal est l'estomac humain malade. Toutes les tentatives pour la trouver dans un estomac normalement sain ont échoué. La maladie qui favorise sa multiplication est l'ulcère du pylore, qui cause, par le rétrécissement de celui-ci, une rétention anormalement longue des aliments. Quand l'ulcère est d'un caractère bénin, ainsi qu'au commencement des formes malignes, il y a une hyperacidité chlorhydrique. Dans ce milieu fortement acide (pH : env. 1,5) et riche en hydrates de carbone, la sarcine trouve son ambiance favorable ; elle se développe intensément sans rien avoir à redouter des rares micro-organismes (levures, etc.) qui peuvent résister à cette forte acidité.

Cependant, lorsque l'acide lactique supplante l'acide chlorhydrique, comme il arrive dans les cas graves de carcinome, la sarcine est tenue en échec par le développement de nombreux autres microbes, parmi lesquels prédomine le long bacille de Boas-Oppler. Il sera démontré plus loin que la sarcine est beaucoup moins résistante à l'acide lactique qu'à l'acide chlorhydrique, mais encore semble-t-il exister, suivant Heissen, dans le suc gastrique de ceux qui souffrent d'un cancer de l'estomac, une enzyme capable de dissoudre les paquets de sarcines.

On a trouvé quelquefois ceux-ci dans l'estomac d'animaux. Virchow en a vu dans un estomac de lapin et mes recherches m'ont amené deux fois au même résultat, quand le contenu stomacal de l'animal (lapin et cobaye), à demi digéré, a été mis en culture dans un moût acidifié. Les animaux étaient en bonne santé et les sarcines, apparemment invisibles au microscope, étaient évidemment des hôtes accidentels de l'estomac, arrivés là mélangés à la nourriture.

Il n'est pas étonnant qu'on les trouve aussi dans l'intestin des malades qui en hébergent dans leur estomac. Les matières fécales normales n'en contiennent pas. Mes investigations ne m'en ont jamais montré, ni dans les fèces humaines, ni dans celles des animaux.

Leur présence habituelle dans le sol, signalée par Beijerinck (1905) est un fait remarquable, que j'ai étudié particulièrement. En premier lieu, il y avait à déterminer quel degré d'acidité était le plus favorable à l'expérience de Beijerinck avec la terre dans une solution acide de moût et dans d'autres milieux; en second lieu, quelles influences exercent les différents acides, et en troisième lieu comment se présentent les sarcines dans les différents échantillons de terre.

Le fait a été établi que les divers échantillons de terre requièrent des quantités d'acide très différents pour donner un résultat positif. Quelques-uns ont besoin d'un pH de 1-2; mais six des échantillons que j'ai examinés ne donnèrent des sarcines qu'avec un moût non acidifié (pH : 5.5). Avec un pH plus élevé, il n'y avait aucun développement parce que d'autres organismes étouffaient les sarcines. A quelques exceptions près, les membres du premier groupe étaient des échantillons

de terre d'une alcalinité initiale élevée. La plupart des membres du second groupe étaient acides. Des échantillons de boue d'un tank-Imhoff et les boues activées se comportent comme le premier groupe. Tous les échantillons de terre paraissent contenir des sarcines lorsqu'ils étaient mis en culture en présence d'une acidité convenable du moût. Une seule exception se révéla : il s'agissait d'un échantillon de terre pris à quelques décimètres de la surface du sol.

Quand j'ai examiné des échantillons provenant de différents points du littoral et des dunes hollandais, ainsi que des Indes-Néerlandaises, ce fait s'est toujours confirmé : ils étaient tous positifs, terre ou boue de la surface de la terre, prélevés n'importe où seuls ceux que je prélevais au-dessous de la surface étaient négatifs.

La sarcine semble donc être un organisme ubiquitaire ; si sa présence quasi-universelle n'a pas été remarquée, c'est apparemment à cause des conditions particulières de son développement.

Il est donc vraisemblable que les germes des sarcines sont transportés à la surface du sol par les vents, ce qui explique qu'on en trouve jusque dans les endroits les plus déserts du littoral et des sables des dunes.

L'action propagatrice du vent a d'ailleurs pu être démontrée en plaçant des assiettes contenant de la terre stérilisée à l'extérieur d'une fenêtre du premier étage du laboratoire ; une plaque de verre formant couverture était placée à 10 centimètres au-dessus des assiettes pour éviter la chute des poussières sales. Après trois semaines, on pouvait trouver des sarcines dans ces échantillons de terre par la culture. On ne doit, par conséquent, pas s'étonner que des fermentations spontanées à sarcines se produisent dans l'estomac humain, quand les circonstances sont favorables ; leurs germes sont partout présents.

L'influence d'autres acides que l'acide chlorhydrique pour acidifier le moût n'est pas seulement fonction du pH de celui-ci : le caractère des molécules non dissociées joue un rôle important. Les acides minéraux sont plus favorables que les acides organiques. Avec un échantillon de terre très riche en sarcines, on a trouvé comme les plus favorables à l'expérience de Beijerinck, les valeurs de pH suivantes :

Acide chlorhydrique	pH : 0,9
Acide sulfurique	pH : 1,5
Acide nitrique	pH : 1,5
Acide phosphorique	pH : 2,0
Acide lactique	pH : 2,9
Acide acétique	pH : 4,7

L'acide oxalique était empêchant avec toutes les valeurs du pH. Comme il a été dit ci-dessus, il est possible que d'autres échantillons aient besoin d'autres acidités. Pour s'en rendre compte, il était intéressant de déterminer quel maximum d'acidité (plus bas pH) est toléré par les cultures pures. Les pH minimum qui permettent une fermentation sont les suivants :

Acide chlorhydrique	0,8
Acide sulfurique	1,1
Acide nitrique (croissance jusqu'à 1,35).	1,5
Acide phosphorique	1,35
Acide lactique	2,8
Acide pyruvique	3,0
Acide oxalique	3,4
Acide acétique	4,1

Les chiffres pour les acides inorganiques s'avèrent encore remarquablement bas. On est étonné de la résistance à de fortes proportions d'acide nitrique; nul autre organisme, à ma connaissance, n'en supporte de semblables. Envers l'acide phosphorique, cette résistance est telle que l'on peut ajouter 70 cent. cubes d'acide normal à 100 cent. cubes de moût sans entraver la fermentation. Mais alors le pH n'est descendu qu'à 1,35 et l'acide n'est pas assez fort pour l'abaisser encore.

L'effet de la fermentation sur le pH dans le moût a été étudié et voici les résultats :

Changement du pH pendant la fermentation (moût de pH = 5,48 avec l'acide chlorhydrique et l'hydroxyde de soude respectivement).

AVANT LA FERMENTATION

17,3
1,61
2,4
2,84
3,65
4,62
5,48
7,32
8,3
8,77
9,16
9,6
9,8

APRÈS LA FERMENTATION

1,4
1,65
2,41
2,9
3,74
4,21
4,6
5,08
5,06
4,84
4,77
5,15
4,84

Quand l'acidité initiale est élevée, la fermentation n'y ajoute rien; les acidités plus basses commençant par $pH : 4,6$ sont accrues et l'alcalinité est changée en une acidité d'environ 5,0, sans égard pour l'alcalinité initiale. Ces faits s'expliquent par une production vigoureuse de CO_2 et d'une petite quantité d'acide acétique fourni par la dégradation du sucre de moût (voir ci-après pour plus de détails).

DÉVELOPPEMENT SUR MILIEUX SOLIDES.

Comme il a déjà été démontré jusqu'à présent par tous les auteurs, la sarcine ne se développe pas sur les milieux solides usuels; ceci en raison des effets de trois facteurs :

- 1° Emploi de matériel trop ancien;
- 2° Milieux non appropriés;
- 3° Conditions aérobies.

Beijerinck a tourné les difficultés et a réussi à obtenir des cultures par ensemencements dans des tubes de moût gélosé qu'il portait à 30-37° C. Dans ces conditions des colonies blanches de sarcines se forment, qui, transplantées dans le moût, reproduisent de nouveau des cultures douées de propriétés fermentantes très actives et qu'on peut facilement purifier par réensemencements successifs (fig. 3).

On a vu qu'il est possible de simplifier cette méthode en mélangeant quelques gouttes d'une culture impure dans un tube de moût gélosé (1) fondu à 50° C. et en versant ce mélange dans une boîte de Petri ordinaire. Dans la couche solidifiée de gélose, de 3-4 millimètres d'épaisseur, les colonies se développent tout à fait normalement (fig. 4). Les bulles de gaz, formées autour d'elles, indiquent leurs propriétés fermentatives. Quand l'ensemencement a été trop abondant, la gélose en est complètement bouleversée (fig. 5). Ceci indique que la présence ou l'absence d'air semble avoir peu d'importance. La protection contre l'oxygène que donne la mince couche de gélose est apparemment suffisante pour permettre un développement parfait. L'ensemencement effectué à la surface de la

(1) Cette gélose n'a pas besoin d'être acidulée quand le matériel qui contient les germes de sarcines est à peu près pur.

gélose est inefficace. Ce n'est que lorsqu'on met un excès de sarcines actives à la surface de la gélose qu'on voit quelques fragments de paquets se développer en colonies, évidemment protégées contre l'air par l'excès de leurs congénères (fig. 6). En plaçant ces boîtes de Petri dans le vide, le développement est plus abondant et on obtient des colonies de surface de quelques millimètres de diamètre (fig. 7). On peut, en raison de ce fait, considérer cet organisme comme anaérobie, quoique pas très rigoureusement.

Avant de procéder à la description morphologique et à l'étude des propriétés physiologiques de *Z. ventriculi*, il faut encore fournir quelques renseignements sur la manière d'obtenir *Z. maxima*.

Lindner a trouvé celle-ci d'abord dans les pâtes de différentes farines (Getreidemaischen) abandonnées à la fermentation butyrique spontanée; mais, par de multiples répétitions de cette expérience, j'ai appris que dans ces conditions le développement est bien pauvre et hasardeux. En général il est annihilé par le développement d'un nombre excessif de bactéries, de sorte qu'on ne trouve que de rares sarcines ou même pas du tout; ces pâtes riches en amidons semblent mieux convenir aux bactéries qu'aux sarcines. Le conseil de Henneberg d'employer une solution de saccharose ne donne pas de meilleurs résultats. L'usage du moût acidulé permet seulement d'obtenir à l'occasion des cultures de *Z. ventriculi* quand il étaitensemencé avec du blé, ce qui prouve que ces organismes sont presque toujours présents sur les céréales.

Toutefois, les résultats sont bien meilleurs quand on emploie du son sans farine, mélangé avec une solution de saccharose de 2 à 3 p. 100 et acidifié fortement avec l'acide chlorhydrique ou mieux encore phosphorique ($pH : 2,1$).

Alors le liquide porté à 37° pendant vingt-quatre à trente-six heures, entre en fermentation vigoureuse (fig. 8) et on y trouve beaucoup de paquets de sarcines d'assez petites dimensions, mais très purement formés, comme le montre la figure 9, qui représente un cas non exceptionnel, où les sarcines s'étaient développées en culture presque pure. Quand une partie du précipité (1 cent. cube) est reportée dans un flacon de moût acide, la fermentation procède comme d'habitude et on peut faire des

cultures à peu près pures de la même manière qu'avec le *Z. ventriculi*. Il n'y a qu'une différence importante : c'est l'odeur du liquide en fermentation et des colonies en gélose. Lorsqu'il s'agit de *Z. ventriculi* l'odeur est alcoolique et pas désagréable, tandis que dans ce dernier cas on observe une odeur d'acide butyrique, qui indique qu'une autre sarcine que celle de Goodsir s'est développée. On peut obtenir des colonies de la même manière que celle décrite ci-dessus. Leur forme et leur couleur sont à peu près les mêmes, mais l'odeur est nettement celle de l'acide butyrique. On peut les identifier avec le microbe de Lindner (quoique ce dernier ne l'ait pas obtenu en culture pure) et leur donner le nom de *Zymosarcina maxima*. Cependant quelques échantillons de son de blé ordinaire donnaient des cultures de *Z. ventriculi* dans les circonstances ci-dessus décrites et presque tous les donnaient avec le moût acide. On a aussi constaté que les deux sarcines se trouvent dans le son et que le développement de l'une plutôt que de l'autre dépend de circonstances encore insuffisamment connues.

MORPHOLOGIE ET PHYSIOLOGIE.

Les propriétés morphologiques de la *Zymosarcina ventriculi* ont été décrites par Goodsir d'une manière si claire qu'elle nécessite peu de commentaires. Les études minutieuses de Suringar ont pleinement confirmé cette description. Elles montrent que le diamètre de chaque élément en coccus d'un paquet de sarcines est de 3,5 à 4 μ , mais que le dédoublement continu dans les trois dimensions perpendiculaires empêche la formation de cubes parfaits aussitôt que le nombre des cellules excède à peu près 60; les cellules s'aplatissent alors l'une contre l'autre et les paquets deviennent irréguliers. Ce phénomène s'observe beaucoup moins dans les cultures de *Z. maxima*. Les paquets restant plus petits, les cellules individuelles sont en général régulièrement formées et gardent leurs formes rondes, lorsque les paquets deviennent volumineux. Leur diamètre est un peu plus grand que celui du *Z. ventriculi*, soit 4 à 4,5 μ . Les paquets sont plus facilement détachables les uns des autres, de telle sorte qu'on peut les diviser en de plus petits en pressant légèrement la lamelle couvre-objet. Dans les

cultures pures en moût, les petits paquets prévalent de nouveau.

En ce qui concerne l'influence de la température, on peut dire que la T. minima se trouve aux environs de 15°C pour les deux organismes, la maxima pour la *Z. maxima* est un peu au-dessus de 40°C, tandis que la *Z. ventriculi* fermente encore à 45°C. La croissance optima pour la *Z. maxima* se fait à 30° et pour la *Z. ventriculi* de 30 à 37°C.

On ne voit jamais de spores, quelles que soient les conditions de sécheresse ou d'humidité. Les examens scrupuleux de Suringar, Beijerinck et tant d'autres investigateurs n'ont jamais permis d'en observer.

Les deux organismes sont facilement colorés par les colorants usuels tels que le bleu de méthylène ou la fuchsine et ils donnent une réaction de Gram positive. Si on met les paquets de sarcines dans des solutions très diluées de colorants, la plupart d'entre eux absorbent la couleur. Plus la culture est vieille, mieux elle se colore. Après la fin de la fermentation tous les paquets prennent le colorant, prouvant que tous sont morts. Dans les cultures en pleine fermentation, au contraire, une petite partie seulement des cellules dans chaque paquet est colorée et la plupart restent incolores : ce sont les cellules jeunes, encore capables de reproduction. Ceci correspond avec le fait mentionné plus haut, que les cultures gardent leur vitalité deux à trois jours seulement et qu'elles doivent être réensemencées dans ce délai.

Lorsqu'on fait agir le réactif de Schultze (solution concentrée de chlorure de zinc, contenant l'iode libre), on peut confirmer ce fait, sur lequel Suringar a le premier attiré l'attention, que la paroi cellulaire de *Z. ventriculi* contient de la cellulose. Suringar recommande de traiter d'abord par l'acide nitrique concentré ou la soude, après quoi la couleur apparaît très nettement; mais déjà sans aucun traitement la coloration violette montre bien les sarcines lorsqu'on les a laissées quelques minutes dans le réactif avant de recouvrir avec la lame couvre-objet. La teinte violette des cellules devient surtout très apparente aux endroits où l'iode a été absorbé et où le liquide est décoloré.

Les *Z. maxima* et *Z. methanica* ne prennent pas cette coloration.

NUTRITION DES SARCINES.

Comme nous l'avons déjà établi, toutes les cultures de sarcines échouent, quand elles sont faites dans un milieu sans sucre, soit avec, soit sans oxygène; pour cette raison les infusions de foin, recommandées par Falkenheim, sont inutilisables. Si au contraire on ajoute du sucre, l'eau peptonée, la décoction de levure ou le bouillon deviennent utilisables pour la croissance de *Z. ventriculi* et de *Z. maxima*. Les sucres fermentescibles sont : dextrose, lévulose, galactose, maltose, sucrose, lactose. Le raffinose, xylose, arabinose sont peu aptes à la culture de *Z. maxima*, et tout à fait inutilisables pour *Z. ventriculi*. L'amidon, les dextrines, la glycérine, la dulcité et la mannite, aussi bien que les acides organiques et leurs sels, sont sans aucun profit pour les deux organismes. Comme source de nitrogène il n'y a que les protéines peptonisées, telles qu'on les trouve dans les peptones du commerce, dans le moût ou l'eau de levure, qui sont favorables à *Z. ventriculi* et à *Z. maxima*. Ni l'asparagine, ni les acides aminés inférieurs comme le glyocolle, ni l'urée, ni les composés inorganiques de l'azote ne sont utilisés; de même le lait, malgré son lactose. *Z. methanica* au contraire ne fermente que les sels d'acide gras avec un nombre pair d'atomes de carbone (1), en employant les sels d'ammoniaque comme source de nitrogène, tandis qu'elle laisse les sucres inchangés.

Aucune des sarcines fermentantes n'est capable de liquéfier la gélatine, comme la plupart des sarcines communes, aérobies, peuvent le faire. Une trace de catalase est formée par *Z. ventriculi*, mais non par les autres espèces. Les graisses et l'amidon ne sont pas transformés; l'esculine et l'indican ne sont que lentement hydrolysés. Le tyrosinase ne peut pas être décelé.

PRODUITS DE MÉTABOLISME.

Les produits de fermentation de *Z. ventriculi* étaient peu connus, ceux de *Z. maxima* pas du tout lorsque j'ai commencé mes investigations. G. Wilson, qui examina les produits dans

(1) La fermentation rapide des formiates est la seule exception. Voir Söhen [23].

le suc gastrique, trouva de l'acide acétique, tandis que quelques auteurs (Hasse, [3] mentionnent souvent l'acide butyrique (l'Essigbutter-säure).

Beijerinck, en analysant les gaz de fermentation, trouvait 75 p. 100 CO_2 et 25 p. 100 H_2 . Il dit avoir trouvé de l'acide lactique, sans toutefois donner des détails sur sa quantité, ni sur la manière dont il l'a reconnu. Ehret [41] en étudiant de nouveaux produits de fermentation dans l'estomac d'un malade qui, pendant trois jours, n'avait consommé que de l'eau, du sucre et du pain, trouva de l'alcool éthylique et des acides acétique et formique. Les gaz collectés étaient « surtout l'acide carbonique, une petite quantité d'hydrogène étant possible ». Il me semblait désirable de compléter ces indications bien sommaires.

Après avoir établi que la *Z. ventriculi* aussi bien que la *Z. maxima* ne peut consommer que 1 1/2 ou 2 p. 100 de sucre fermentescible en solution de peptone ou d'eau de levure (la fermentation s'arrête là et laisse les doses plus fortes inattaquées), 1 litre d'une solution à 2 p. 100 de dextrose et de lévulose en un de ces milieux a été abandonné à la fermentation. On acheva de remplir les récipients avec de la paraffine stérile, et on les ferma avec un bouchon de caoutchouc stérilisé, à travers lequel passait un tube à robinet et un second tube pour conduire les gaz dans un autre récipient rempli d'une solution saturée de chlorure de sodium. Après ensemencement de quelques centimètres cubes d'une culture pure en pleine activité fermentative par le tube à robinet, la fermentation ne tarda pas à s'établir, et une partie de la paraffine liquide fut refoulée dans le second récipient dont elle recouvrit la solution de sel, la séparant ainsi des gaz, ce qui empêcha la dissolution de ces derniers dans la saumure. Après quelques jours de fermentation active le processus s'arrêta et on sépara les deux récipients, après qu'un léger chauffage du premier eut chassé la plus grande partie des gaz dissous. La production totale des gaz fut alors mesurée et analysée. Dans la liqueur fermentée les produits du métabolisme furent étudiés d'après les méthodes courantes (4). Avec la *Z. maxima* deux expériences de fermentation, l'une avec et l'autre sans addition de carbonate de

(4) Pour les détails voir ma monographie : *Die Gärungssarcinen* (Gustav Fischer, Jena, 1930).

chaux stérilisé, furent mises en marche. L'addition de carbonate accrût la proportion du sucre fermenté de 0,6 à 1,4 p. 100 et fit varier les quantités d'acide formé (voir tableau I).

TABLEAU I. — Produits de métabolisme de *Zymos. ventriculi* et de *Zymos. maxima*.

PRODUITS (Pourcentage de sucre fermenté)	<i>Z. ventriculi</i>		<i>Z. maxima</i>	
	Eau de levure avec 2 p. 100 de dextrose (1,52 p. 100 de fermenté)	Eau de levure avec 2 p. 100 de lévulose (1,94 p. 100 de fermenté)	Eau de levure avec 2 p. 100 de dextrose (0,6 p. 100 de fermenté)	Eau peptonée 1,50 p. 100 de lévulose + calc. carbon. (1,4 p. 100 de fermenté)
Acide carbonique. . . .	41,7	45,2	36,3	38,7
Hydrogène	0,58	0,7	2,55	2,36
Alcool éthylique	40,3	50,6	Trace.	Trace.
Acide formique.	1,08		1,05	0,72
Acide acétique	9,0	3,7	10,0	17,3
Acide butyrique			37,1	25,4
Acide succinique			3,44	1,95
Acide lactique	3,05		10,7	7,7
Acétol-méthyl-carbinol.	Trace.	0,06		
Total	97,72	100,26	101,14	94,13

L'analyse met en évidence ce fait que les produits principaux du métabolisme de *Z. ventriculi*, aussi bien du dextrose que du lévulose, sont l'acide carbonique et l'alcool éthylique en quantités à peu près égales. Ce métabolisme montre donc une ressemblance presque complète avec la fermentation alcoolique ordinaire; seule la production d'acide acétique et d'une petite quantité d'hydrogène l'en distingue. *Z. maxima*, au contraire, ne produit pas d'alcool, mais une quantité considérable d'acide butyrique, comme l'odeur des cultures l'indiquait déjà et, en outre, se forment encore des quantités minimales d'acides succinique et lactique. Ces produits sont analogues à ceux des bactéries de fermentation butyrique, auxquelles la *Z. maxima* semble être physiologiquement apparentée. Ainsi on comprend pourquoi l'acidité (pH) des cultures de *Z. ventriculi* reste constante ou augmente quand le pH initial est bas, et diminue jusque vers 5, lorsqu'il est élevé. L'acide carbonique formé n'est pas capable d'accroître l'acidité, mais il change facilement

une neutralité ou une alcalinité initiale en acidité correspondant à celle d'un liquide qui est saturé de ce gaz et dont le pH est voisin de 5. La valeur finale de pH dans les cultures de *Z. maxima* se trouve abaissée, en rapport avec la formation d'un peu d'acide butyrique. La fermentation gastrique produit toujours une odeur alcoolique et ne révèle jamais la présence d'acide butyrique. Ce fait démontre que *Z. maxima* ne se développe pas dans l'estomac malade, tandis que les sarcines des pâtes de farine donnent une fermentation butyrique, ce qui indique qu'il s'agit de *Z. maxima*.

Le métabolisme de *Z. methanica*, comme l'a établi depuis longtemps Söhngen [23], produit du méthane, de l'acide carbonique et du carbonate de chaux en présence des sels calcaires des acides gras. Quand on réalise artificiellement cette fermentation à 35 ou 37° C., les sarcines sont petites, mais quand la fermentation méthanique se produit dans la nature et à la température ordinaire, les paquets de sarcine ont des proportions beaucoup plus volumineuses jusqu'aux dimensions de *Sarcina paluosa*, telle qu'elle a été décrite dans la littérature, et elles ressemblent alors à *Z. ventriculi*. La ressemblance devient tout à fait grande quand on traite de la boue (surtout celle provenant de lits bactériens percolateurs) avec une solution d'acétate de chaux à 20° C. environ. Le mélange se met rapidement en fermentation méthanique et la boue révèle des paquets de sarcines de grandes dimensions (fig. 10), qu'on ne peut distinguer de *Z. ventriculi*. Mais les cultures pures de ce dernier organisme ne donnent pas de fermentation dans une solution à l'acétate, tandis que les cultures méthaniques, purifiées autant que possible par des transplantations multiples, ne fermentent pas les solutions sucrées propres à la fermentation par *Z. ventriculi*.

La dernière question que voici demande une réponse : Quelle peut être la raison pour laquelle *Z. ventriculi* et *Z. maxima*, si répandues dans la nature sur toutes espèces de substratums, restent en vie sur ces derniers pendant des mois et même des années, tandis que les cultures pures de ces organismes meurent en deux ou trois jours, de sorte qu'on doit les transplanter tous les deux jours pour les conserver vivantes ?

La formation de spores est exclue d'après toutes les expé-

riences. Ni quand on sèche les sarcines en fermentation active, ni quand on les mélange à de la chaux stérilisée, sable ou terre, sec ou humide, à nu ou immergées dans l'eau ou dans une solution sucrée (où les levures survivent si longtemps), ni dans l'eau d'égout, elles ne peuvent survivre. Toutes les tentatives faites pour prolonger leur vitalité dans les conditions les plus variées ont échoué. On peut admettre sans réserves que les paquets de sarcines, transportés dans les conditions de la nature libre, meurent aussi rapidement. Or, tout au contraire, quelles que soient les conditions extérieures de conservation des matériaux comme le sable, la terre sèche ou immergée, ils conservent intacte pendant des mois la propriété d'engendrer des fermentations à sarcines bien qu'on puisse affirmer avec certitude que ces matériaux ne contiennent pas de paquets de sarcines apparemment vivantes. Et ceci est confirmé par l'examen microscopique des dits matériaux. La recherche la plus minutieuse pour y trouver des organismes sarcineux n'a jamais pu permettre d'y découvrir la présence d'un seul paquet de sarcines ou de cocci de $3\frac{1}{2}$ à $4\ \mu$, soit en préparations colorées, soit par examen à l'état frais de quantités allant de 0,2 à 0,5 jusqu'à 2 grammes, amplement suffisantes pour assurer une fermentation.

La conclusion à tirer de ces observations est que les sarcines existent et gardent leur vitalité dans les matériaux naturels, comme la terre et le sable, sous une forme invisible ou différente de celle qui nous est connue, et que cette forme possède une vitalité considérable.

L'expérience suivante illustre cette différence d'une manière frappante. Une portion de sable ordinaire (dont 0 gr. 5 donne généralement une fermentation sarcineuse dans un moût acide) est partagée en deux parties : l'une (A) est stérilisée et l'autre (B) est laissée dans de l'eau de conduite ordinaire. La partie stérilisée est ajoutée à une quantité convenable de moût etensemencée avec une culture de *Z. ventriculi*. Quand la fermentation (à 30° C.) commence à diminuer, le liquide est jeté et le sable, nettoyé par lavage, est gardé également dans de l'eau ordinaire. L'examen microscopique de cette partie montre une quantité de paquets de sarcines entre les grains de sable, tandis que la portion B n'en contient aucun.

Le jour suivant, il est généralement possible d'obtenir une fermentation sarcineuse avec les deux parties, mais dès le second jour ce n'est plus possible, et ce ne sera possible dans les mois suivants, qu'avec le sable de la partie B. En attendant, les sarcines de la partie A restent visibles et inaltérées, mais paraissent avoir perdu toute vitalité. Il n'apparaît jamais d'organismes d'une autre forme ni des spores dans les cellules existantes, tandis que la partie B reste vide au point de vue optique.

Les paquets de sarcines représentent évidemment une forme de vie de ces organismes extrêmement délicate et, une fois constitués, il ne semble pas y avoir de possibilité de les ramener à l'état originel dans lequel les sarcines restent en vie dans la nature.

Cette résistance est démontrée aussi par leur comportement envers les températures élevées et envers les antiseptiques. Les cultures pures sont très sensibles à l'une et aux autres. *Z. ventriculi*, dans le sable et l'eau, est tuée à 65° C. en dix minutes (sans sable, 55° C. est déjà une température mortelle); *Z. maxima* meurt en vingt minutes à 55° C. Le sable brut lui-même exige dix minutes à 75° C. et le son quinze minutes à 60° C. avant que le développement de sarcines devienne impossible.

L'influence des antiseptiques a été étudiée avec l'acide chlorhydrique 0,1 N., la soude 0,1 N., l'acide phénique 1 p. 100 et 5 p. 100, l'alcool (96 p. 100 et 70 p. 100) et l'éther (saturé d'eau). Envers toutes ces substances à l'exception de l'acide chlorhydrique, les sarcines se montrent très sensibles (la mort survenant dans les dix minutes), tandis que dans le sable elles résistent pendant quelques heures, sauf en présence de soude 0,1 N. (moins de dix minutes) et d'acide phénique 5 p. 100 (quinze minutes).

Dans un autre travail nous essaierons d'établir si les sarcines sont susceptibles d'exister sous une forme occulte ou invisible.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] John GOODSIR, History of a case in which a fluid periodically ejected from the stomach, contained vegetable organisms of an undescribed form. *Edinburg. Med. and surgical review.*, vol. LVII, 1841, p. 430.
- [2] R. VIRCHOW. *Virchow's Archiv.*, vol. I, 1847, p. 264.
- [3] K. E. HASSE. *Mitt. der Natur. Gesellsch.*, in Zurich, vol. I, 1847, p. 65, et 81.

- [4] W. F. R. SURINGAR, De sarcine (*Sarcina ventriculi* Goodsir.) Monographie. Leeuwarden, 1865. *Arch. Néerland. d. Sc. ex. et natur.*, 1, 1866, p. 209.
- [5] H. FALKENHEIM. *Arch. f. exper. Pathol. und Pharmak.*, vol. XIX, 1885, p. 329.
- [6] B. OPPLER. *Münch. Med. Wochenschr.*, 1894, p. 570.
- [7] Th. GRUBER. *Arch. a. d. Bakt. Inst. der Techn. Hochschule in Karlsruhe*, vol. I, 1897, p. 239.
- [8] L. COYON. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 51, 1899, p. 967.
- [9] F. C. STUBENRATH, Das Genus *Sarcina*. Habilitationsschrift. München, 1897.
- [10] LEHMANN UND NEUMANN. *Bakteriol. Diagnostik*, 6^e ed., p. 202.
- [11] H. EHRET. *Mitt. a. d. Grenzgeb. d. Chir. u. Medizin*, vol. 11, 1897; p. 744; vol. III, 1898, p. 579.
- [12] R. LATZEL. *Medizin Klinik.*, vol. XIV, 1918, p. 183, 164, 190.
- [13] M. W. BEIJERINGK. *Arch. Néerland. D. Sc. ex. et nat.*, série 2, 11, 1906, p. 199; de même : Proceedings of the section of sciences. *Kon. Akad. v. Wetenschappen*. Amsterdam, vol. VII, 1905, p. 580.
- [14] M. W. BEIJERINGK, Proceedings Sect. of Sciences. *Kon. Akad. v. Wetenschappen*, Amsterdam, vol. XIII, 1914, p. 1237.
- [15] D. GERHARDT. *Münch. Med. Wochenschr.*, vol. LXVI, 1919, p. 1400.
- [16] FR. HEISSER. *Arch. f. Verdauungskrankheiten*, vol. XXVII, 1921, p. 218.
- [17] J. BOAS. *Diagnostik und Therapie der Magenkrankh.* 8^e et 9^e Ed., 1926, p. 243.
- [18] P. LINDNER, Die *Sarcina*organismen der Gärungsgewerben. Dissertation. Berlin, 1888.
- [19] W. HENNEBERG. *Handbuch der Gärungsbakteriologie*, vol. I, p. 105.
- [20] J. SCHRÖTER, Die Kryptogamenflora Schlesiens par F. Cohn. Part : Pilze, 1839.
- [21] J. WILHELM. *Kompodium der biol. Beurteilung des Wassers*, juin 1915, p. 7.
- [22] R. KOLKOWITZ. *Ber. dd. Bot. Gesellsch.*, vol. XLVI, 1928, p. 29.
- [23] N. L. SÖHNGEN, Dissertation. Delft., 1906.

EXPLICATION DES PLANCHES

- FIG. 1. — Fermentation déterminée par du sable en moût acide ($pH = 1,7$). Grande masse de *Z. ventriculi* entre les grains de sable. (Grossis. : 135.)
- FIG. 2. — Dépôt de *Z. ventriculi* à peu près pur dans un liquide en fermentation. Gros paquets de sarcines. (Grossis. : 250.)
- FIG. 3. — Culture pure de *Z. ventriculi* provenant d'une colonie en gélose-malt. (Grossis. : 330.)
- FIG. 4. — Colonies en gélose-malt, coulée dans une boîte de Petri. Les bulles de gaz indiquent la fermentation. (2/3 grand. naturelle.)
- FIG. 5. — Plaqueensemencée trop fortement. La gélose est dilacérée par les gaz. (2/3 grand. naturelle.)
- FIG. 6. — Colonies aérobies de *Z. ventriculi*. Quoiqu'ensemencée abondamment quelques colonies seulement se sont développées. (Grand. presque naturelle.)
- FIG. 7. — Colonie anaérobie sur gélose-malt. (Grossis. : 15, 6.)
- FIG. 8. — Fermentation causée par *Z. maxima* dans du son de blé et une solution acide de sucrose.
- FIG. 9. — Préparation microscopique du dépôt de fermentation précédent. *Z. maxima* à peu près pure. (Grossis. : 620.)
- FIG. 10. — *Z. methanica* provenant de boue de drainage et produisant une fermentation dans une solution d'acétate de chaux à 20°C. (Grossis. : 285.)

RECHERCHES
SUR LE CYCLE ÉVOLUTIF ET LA CULTURE
D'*AMÆBA DIPLOIDEA*
HARTMANN ET NÄGLER (1908),

par R. DESCHIENS.

Hartmann et Nägler, en 1908, ont signalé dans l'intestin d'un lézard (*Lacerta agilis*) une amibe caractérisée par la présence constante d'un double noyau et par un cycle évolutif très particulier; ils ont désigné cette amibe sous le nom d'*Amœba diploidea*.

Nägler, en 1909, a particulièrement étudié la morphologie et une partie du cycle évolutif de cette amibe qu'il a cultivée sur une gélose nutritive (gélose, 1 gramme, bouillon nutritif, 40 cent. cubes, eau de robinet, 90 cent. cubes) par ensemencement du contenu de l'intestin terminal de *Lacerta agilis*. La présence de cette amibe dans l'intestin d'un lézard paraît d'ailleurs fortuite, car Nägler ne l'a observée qu'une seule fois chez 20 lézards examinés; aussi cet auteur admet-il que *A. diploidea* est une amibe du sol, occasionnellement ingérée par le lézard.

J. Robic et moi avons observé, dans un échantillon de terre humide provenant des jardins de l'Institut Pasteur de Paris, une amibe que j'ai identifiée à *A. diploidea* et dont je fais ici l'étude. J'indique dès maintenant que l'étude morphologique des formes végétatives adultes et des kystes, que j'ai faite, est superposable aux données morphologiques recueillies par Nägler; en outre, j'ai retrouvé dans ses détails le cycle gamogonique étudié par cet auteur; mais, d'autre part, j'ai pu faire une étude complète de la schizogonie non décrite par Nägler et observer la formation de mérozoïtes.

MORPHOLOGIE DE L'AMIBE ADULTE. — En culture sur gélose Musgrave, la forme végétative adulte (fig. 1), fixée au Bouin et colorée par l'hématoxyline ferrique, mesure de 15 à 33 μ de

diamètre, avec un maximum de fréquence de 30 μ . Les formes en voie de division peuvent atteindre 40 μ . A l'état frais, la taille varie de 12 à 50 μ .

A. diploidea possède constamment deux noyaux qui sont des noyaux-gamètes indépendants, comme l'a établi Nägler. Ces noyaux ovoïdes mesurent 7 $\mu \times$ 5 μ environ; ils sont généralement en contact l'un avec l'autre sur une plus ou moins grande surface. Chaque noyau contient un caryosome prenant fortement la laque ferrique et entouré d'une zone claire pouvant renfermer de la chromatine répartie en fines granulations.

Le cytoplasme a une structure granulo-alvéolaire et contient fréquemment de grandes vacuoles digestives.

A l'état frais, cette amibe présente un ectoplasme hyalin et un endoplasme granuleux, surtout différencié pendant le déplacement de l'amibe. L'ectoplasme émet assez brusquement des pseudopodes peu volumineux, prenant parfois un aspect en houppes ou présentant des plissements de surface comme chez certaines amibes de la terre, du type *Wahlkampfa*. Le déplacement, relativement lent, se fait par une expansion ectoplasmique qui entraîne l'endoplasme. L'endoplasme contient souvent une ou plusieurs grosses vacuoles contractiles.

Kystes (1). — Les kystes que l'on peut observer dans les cultures âgées de quatre à quarante-cinq jours mesurent de 11 μ à 20 μ ; ils présentent une épaisse membrane et un cytoplasme granuleux. Les kystes de formation récente (fig. 6) quadrinucléés ont une taille de l'ordre de 20 μ ; ils contiennent deux amibes conjuguées binucléées; les kystes plus âgés contiennent deux amibes uninucléées (conjugaison des noyaux) et mesurent 15 μ environ; les deux individus sont encore séparés par une membrane.

La taille du kyste décroît, dans les cultures, au fur et à mesure que se développent les phénomènes de fécondation, puis de réduction chromatique, jusqu'à la taille minimum de 11 μ qui répond aux kystes mûrs binucléés (fig. 9) aptes à libérer leur contenu si des circonstances convenables se présentent.

Cette décroissance de la taille des kystes est peut-être liée à une dessiccation du milieu.

(1) Les mensurations indiquées ci-dessous ont été faites sur des préparations fixées au Bouin et colorées par l'hématoxyline ferrique.

Nous n'envisageons dans ce paragraphe que l'étude morphologique des kystes; leur signification biologique et leur place dans le cycle évolutif seront étudiées plus loin.

DIVISION BINAIRE. — Cette division commence par le noyau, avec les caractères décrits par Nägler : C'est une Promitose, les noyaux se partagent en même temps de façon à peu près égale et l'on a des figures de division placées parallèlement; lorsque la mitose est plus avancée, il est fréquent de voir les figures de division prendre un aspect en croix, une figure de mitose croisant l'autre. Le cytoplasme se divise à son tour et chaque nouvelle amibe reçoit la moitié de chaque noyau.

Nägler a signalé des formes à 4 et 6 noyaux qu'il interprète comme résultant de divisions nucléaires successives non suivies de division cytoplasmique. Ces formes, qu'il considère comme accidentelles, correspondent en réalité à des figures de schizogonie ainsi que nous allons l'établir.

SCHIZOGONIE OU DIVISION MULTIPLE. — Dans les cultures de huit à treize jours, on note la présence d'amibes quadrinucléées dont chaque noyau est en voie de division et d'amibes octonucléées de 15 μ à 25 μ .

Ces amibes à 8 noyaux ne tardent pas à présenter des plans de clivage et l'amibe octonucléée se trouve divisée en 4 petites amibes binucléées qui s'isolent d'un reliquat cytoplasmique (fig. 3) et se séparent (fig. 4).

Ces petites amibes, qui mesurent d'abord de 8 μ à 10 μ augmentent rapidement de taille pour atteindre les dimensions de l'amibe adulte dont elles ont ensuite le comportement.

Ces éléments du cycle schizogonique n'ont pas été signalés par Nägler. Cet auteur a cependant observé des amibes hexanucléées, mais il les interprète comme des éléments anormaux et il ne les rattache pas au cycle évolutif de l'amibe; il n'a pas noté l'apparition de plans de clivage et la division de l'amibe octonucléée en 4 petites amibes binucléées.

Les éléments que nous venons de décrire figurent les étapes d'une véritable schizogonie; la constance de l'apparition des formes octonucléées dans les cultures, vers le onzième jour, leur division en 4 petites amibes binucléées qui se séparent et

reproduisent une amibe adulte, est conforme à ce qui a été décrit chez différentes amibes (en particulier *A. minuta*) comme un stade schizogonique. Il s'agit là d'une schizogonie au sens strict du mot.

GAMOGONIE. — Dans les cultures sur gélose Musgrave, on note, du quatrième au dixième jour, une conjugaison des amibes, conjugaison décrite pour la première fois par Nägler et qui se traduit par les phénomènes suivants : 2 amibes de même taille se conjuguent (fig. 5) ; les 2 amibes conjuguées s'entourent d'une membrane épaisse commune et constituent un kyste contenant 2 amibes binucléées nettement distinctes ; à ce moment, les noyaux présentent un aspect particulier ; le gros caryosome central diminue de volume et la chromatine se présente sous l'aspect de grains qui disparaissent progressivement.

Après dix à vingt jours de copulation, les 2 noyaux d'une même amibe se fusionnent et les caryosomes se réunissent ; ces phénomènes marquent le stade de la fécondation (isogamie).

La fusion nucléaire est suivie d'une fusion cytoplasmique et la membrane de séparation des amibes disparaît.

La fécondation proprement dite achevée, on se trouve donc en présence d'un kyste contenant une seule amibe binucléée, chaque noyau étant d'une lignée différente de l'autre (fig. 7).

A mesure que ces phénomènes se développent, on observe une diminution de volume des kystes qui, mesurant 20 μ de diamètre peu après la conjugaison, atteignent 12 à 15 μ de diamètre après la fécondation.

Aussitôt que la fécondation proprement dite a eu lieu, on assiste à des phénomènes de réduction chromatique (fig. 8). Ces figures réductrices s'observent dans des cultures de trente à quarante-cinq jours :

Les 2 noyaux du kyste résultant de la fécondation se divisent une première fois (équivalent d'une première mitose de maturation ou de l'émission du premier globule polaire) ; l'un des noyaux résultant de cette première division dégénère, le noyau subsistant se divise une seconde fois (deuxième mitose de maturation ou émission du second globule polaire) et l'un des noyaux résultant de cette seconde division dégénère.

Comme les 2 noyaux se divisent parallèlement ou à un court

intervalle de temps, on observe souvent une disposition conforme à celle indiquée figure 8; à l'intérieur d'un kyste, on note 2 noyaux en division à des stades parfois un peu différents (noyaux subsistants) et 2 noyaux en dégénérescence ou 2 noyaux de réduction (restes nucléaires).

Comme les noyaux de réduction peuvent se diviser encore

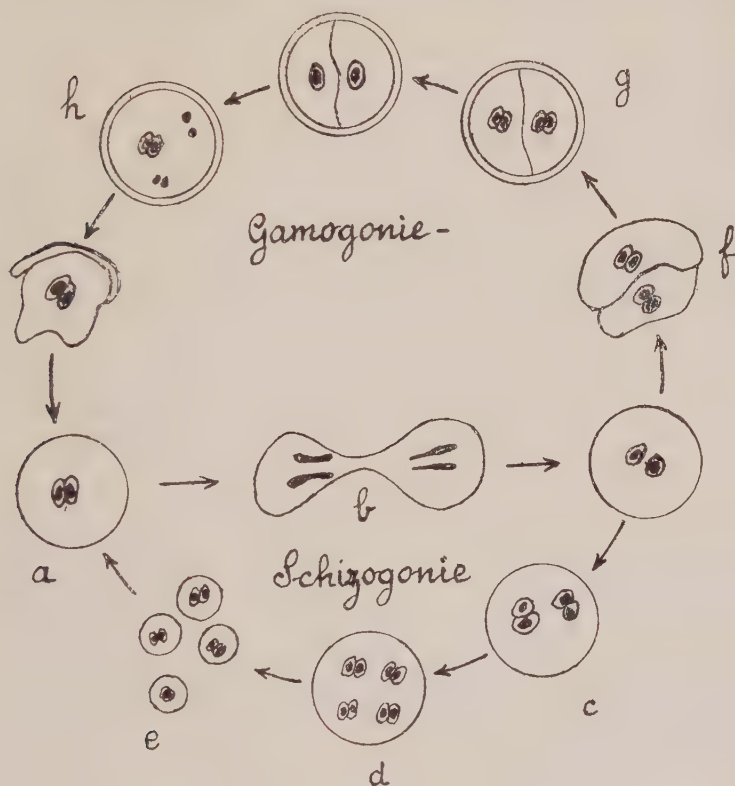


FIG. 4. — Cycle évolutif d'*Amœba diploidea* (demi schématique).

une fois avant de dégénérer, on peut observer des kystes présentant 2 noyaux subsistants et 6 noyaux de réduction qui disparaissent; on aboutit enfin au kyste mûr prêt à se développer si des conditions favorables se présentent (fig. 9).

CYCLE ÉVOLUTIF D'*Amœba diploidea*. — Ce cycle se résume de la façon suivante (fig. 10) :

La forme végétative adulte (*a*) se multiplie par division binaire (*b*).

Schizogonie. — Après une période de division binaire de huit à treize jours (dans les cultures), apparaît un stade schizogonique; le double noyau de l'amibe se divise successivement deux fois (*c* à *d*) et on aboutit à une amibe octonucléée (*d*) avec noyaux groupés par paires. Cette amibe présente des plans de clivage et se divise en 4 petites amibes binucléées qui sont de véritables mérozoïtes (*e*); reproduisant chacun une amibe adulte (*a*).

Gamogonie. — Entre le troisième et le dixième jour, dans les cultures, on note une conjugaison des amibes (*f*), les amibes conjuguées s'enkystent (*g*), les 2 noyaux accolés de chaque amibe binucléée fusionnent (fécondation), la membrane de séparation disparaît et on obtient finalement un kyste contenant une amibe binucléée à noyaux accolés (*h*), chaque noyau étant de lignée distincte; après la fécondation apparaissent des phénomènes de réduction chromatique qui conduisent au kyste mûr, binucléé, donnant naissance, lorsque des conditions favorables à son développement apparaissent, à une amibe végétative (*a*).

CULTURE D'*Amæba diploidea*. — J'ai obtenu de riches cultures impures, ainsi que la culture pure mixte (avec *Bacterium coli*) sur gélose Musgrave, en tube incliné capuchonné ou en boîte de Petri; la gélose doit être maintenue humide par addition de 1/2 cent. cube d'eau distillée par tube.

La richesse de la culture en amibes est généralement à son maximum entre le deuxième jour et le quatrième jour, puis la densité en amibes décroît.

Les formes végétatives deviennent rares vers le dixième jour; entre le quatrième et le quatorzième jour s'observe la conjugaison à laquelle l'enkystement succède; après quinze jours on n'observe généralement plus que des kystes dans les cultures.

Entre le dixième et le quinzième jour, la fréquence des figures schizogoniques est plus grande que dans la période antécédente.

Dans les kystes observés après trente à quarante-cinq jours de culture, on note des figures de réduction chromatique.

Les kystes peuvent se conserver pendant dix mois à un an.

au moins; leur ensemencement, après cette longue période, donne une nouvelle culture.

Les cultures peuvent être infectées par des Chytridinées du genre *Sphærита*. Ces champignons se présentent sous l'aspect de masses sporangiales de volume variable ($1\ \mu$ à $20\ \mu$) contenant parfois seulement quelques spores, mais le plus souvent un nombre considérable de spores. Il s'agit là de sporanges mûrs, mais on peut trouver également des formes jeunes du champignon possédant un noyau punctiforme et des stades assez avancés se présentant sous l'aspect d'une masse plasmodiale dont la taille varie de $1\ \mu$ à $30\ \mu$ et dont le nombre des noyaux varie également en fonction de l'âge du parasite.

L'aspect morphologique du champignon est absolument comparable à celui de la Chytridinée du genre *Sphærита* décrite par Chatton et A. Brodsky (1909), chez *Amœba limax* Duj. et à celui de la Chytridinée étudiée par A. Lwoff (1925), chez *E. coli* et *E. dysenterix* (1).

Ces champignons détruisent les amibes en quelques jours si l'on ne prend pas les dispositions suivantes :

En présence de l'infection des cultures par les *Sphærита*, on procédera à des repiquages, à quarante-huit heures d'intervalle, sur gélose inclinée en tubes, onensemencera la partie inférieure de la gélose; sur boîte de Petri onensemencera la zone centrale de la plaque de gélose. Après quarante-huit heures, les amibes saines ont gagné la partie supérieure de la gélose inclinée ou la surface périphérique de la plaque de gélose; on prélèvera les amibes sur ces surfaces saines pour repiquer sur des milieux neufs; après 3 ou 4 repiquages, on est généralement débarrassé des Chytridinées.

CONCLUSIONS.

En cultivant une souche d'*Amœba diploidea* provenant de la terre humide sur gélose Musgrave, j'ai vérifié les données

(1) Des *Sphærита* ont été signalées chez un grand nombre de protistes libres ou parasites et en particulier chez *Endolimax nana*, par Dobell (1918), chez *Entamœba coli*, par Mesnil et Roubaud (1916) et par Craig (1918). J'ai moi-même noté la présence de *Sphærита* chez *Trichomonas intestinalis* et *Chilomastix mesnili*.

apportées par Nägler sur la morphologie et la biologie de cette amibe.

La division directe et la gamogonie ont été établies par cet auteur, mais la schizogonie d'*A. diploidea* n'avait jamais été observée et décrite jusqu'à ce jour, à ma connaissance.

J'ai pu mettre en évidence la phase schizogonique du cycle évolutif d'*A. diploidea* : après huit à treize jours, le double noyau de certaines amibes se divise à deux reprises successives et on note la présence d'amibes quadrinucléées, puis octonucléées, avec noyaux groupés par paires. Ces amibes présentent bientôt des plans de clivage et se divisent en 4 petites amibes (mérozoïtes) qui reproduisent chacune une amibe adulte.

Les cultures d'*A. diploidea* peuvent être infectées par des Chytridinées. Des repiquages sélectifs permettent de se débarrasser de ces champignons.

(Laboratoire de Protistologie de l'Institut Pasteur.)

BIBLIOGRAPHIE

- ALEXEIEFF. *Bull. Zool. de France*, **37**, 1912, p. 62, 157 et 161.
 CHATTON (E.). *Bull. Zool. de France*, **37**, 1912, p. 113.
 CHATTON (E.) et BRODSKY (A.), Le parasitisme d'une Chytridinée du genre *Shpærila* Dangeard chez *Amœba limax* Dujard. Etude comparative. *Arch. f. Protistenkunde*, Band 17, 1909.
 CRAIG. *Indian Il of Med. Res.*, **6**, 1918, p. 463.
 HARTMANN (M.) et NAGLER (K.), Copulation bei *Amœba diploidea* mit ständigbleiden der Gametenkerne während des ganzen Lebenscyclus. *Sitz. Ber. d. Ges. d. Naturf Freunde*. Berlin, 1908.
 LWOFF (A.), Chytridinées, parasites des amibes de l'homme. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **18**, f. 1, 1925, p. 18-23.
 NAGLER (K.), Entwicklungsgeschichtliche Studien über Amöben. *Arch. f. Protistenkunde*, **15**, 1909, p. 31-38.
 ROBERT (A.). *Les Protozoaires*. Paris, 1914.
 WENYON (C. M.). *Protozoology*. Londres, 1926, p. 180-181.

SUR LES CONDITIONS DE CULTURE ET LE POUVOIR DE SYNTHÈSE DE *SAPROLEGNIA SP.*

ÉTUDE QUALITATIVE DE L'ALIMENTATION CARBONÉE, AZOTÉE ET SULFURÉE

par MICHEL VOLKONSKY

(*Laboratoire de Prostistologie de l'Institut Pasteur*)

Ce travail a été fait avec la souche isolée et étudiée par J. Chaze (1925) et conservée depuis en culture pure au laboratoire de Botanique du P. C. N. Nous en devons la possession à l'obligeance de M. Guilliermond (1).

La nutrition de *Saprolegnia* a été étudiée avec du mycélium ensemencé en milieu liquide, dans des tubes de verre Pyrex de 15×150 millimètres, contenant 9 cent. cubes de solution nutritive. Les cultures, bactériologiquement pures, ont été conservées à l'abri de la lumière directe et à la température du laboratoire ; cette dernière oscillant quotidiennement entre 17°-18° le matin et 20°-22° le soir.

Comme il est malaisé d'effectuer de nombreux ensemencements à partir d'une même culture en milieu liquide (étant donné la résistance des filaments mycéliens), ce sont des milieux gélosés qui nous ont servi pour la conservation des souches. Ces milieux ont servi également lorsqu'il s'est agi de substituer un régime alimentaire donné à un autre, pour l'élimination des traces de l'ancien milieu et l'adaptation du champignon au niveau.

MILIEUX GÉLOSÉS. — Nous avons utilisé des milieux de même composition que les milieux liquides, additionnés d'une quantité de gélose suffisante pour l'obtention d'un ensemble rigide

(1) La détermination exacte de cette souche ne peut être faite, étant donné qu'on n'en peut obtenir la reproduction sexuée (voir Chaze, *loc. cit.*).

(de 13 à 48 p. 1.000 suivant la composition et l'acidité du milieu). La gélose doit être préalablement lavée quarante-huit heures à l'eau courante, puis à l'eau bidistillée plusieurs fois renouvelée. Même avec ces précautions, la gélose contient des impuretés en quantité suffisante pour assurer une croissance de *Saprolegnia* — à vrai dire, très médiocre — en l'absence de corps sulfurés surajoutés. L'existence de ces impuretés dans le fragment de gélose, qui est introduit avec le mycélium au moment du premier repiquage en milieu liquide, se manifeste par une « croissance résiduelle » du champignon dans un milieu incomplet. Un deuxième repiquage dans le même milieu est alors impossible.

Les milieux gélifiés présentant l'avantage d'assurer une survie très prolongée du mycélium : pratiquement, elle est limitée par la dessiccation du milieu. D'autre part « l'effet bios » ne se fait pas sentir en présence de gélose, chose importante lorsqu'il s'agit d'étudier la croissance de *Saprolegnia* dans des milieux simples, pauvres en substances organiques.

MILIEUX LIQUIDES. — La présence d'impuretés diverses dans la gélose oblige à recourir aux milieux liquides pour l'étude de la nutrition des *Saprolegnia*. Notons que la culture en milieu liquide permet de réaliser des conditions qui se rapprochent du mode de vie naturel de *Saprolegnia*, champignon aquatique.

Les expériences de J. Chaze montrent que *Saprolegnia* *sp.* présente une grande tolérance vis-à-vis des variations de pression osmotique du milieu. D'un autre côté, il possède un pouvoir de concentration élevé vis-à-vis des substances alimentaires (1). Tout ceci permet de faire varier la composition du liquide nutritif dans de larges limites.

Nous avons fixé la composition minérale de nos milieux à la formule suivante :

Eau bidistillée, en centimètres cubes . . .	1.000
PO_4HK_2 , en gramme.	0,1
Cl_2Mg , en gramme	0,1
Cl_6Fe_3	Traces.
NaOH	Q. S. pour $\text{pH} = 7,0$.

(1) Nous voulons dire par là qu'il est capable de se développer aux dépens de solutions très diluées de substances nutritives.

Lorsqu'il était nécessaire d'accroître le pouvoir tampon du milieu, sa composition était modifiée ainsi :

Eau bidistillée, en centimètres cubes . . .	1 000
Acétate de Na, en gramme	1,0
PO ₄ HK ₃ , en gramme	1,0
Cl ₂ Mg, en gramme	0,1
Cl ₃ Fe	Traces.
NaOH	Q. S. pour pH = 7,0.

Ces deux milieux nous ont servi au cours de toutes nos expériences.

MORPHOLOGIE DES CULTURES EN MILIEU LIQUIDE. — Si un petit fragment de gélose chargé de mycélium est déposé au fond d'un tube contenant une solution alimentaire, des filaments mycéliens se développent et montent vers la surface du liquide ; arrivés là, ces filaments se ramifient abondamment, au point de constituer un disque feutré très serré. La surface supérieure de ce disque mycélien est *effectivement émergée* : ainsi, une goutte d'eau déposée sur cette surface ne l'imprègne pas immédiatement, mais reste sphérique ; l'immersion du disque nécessite un certain effort, et, une fois immergé, il entraîne souvent une petite bulle d'air collée à sa surface.

Ayant atteint un certain développement, le premier disque mycélien plonge généralement et, au-dessus de lui, se développe alors un disque nouveau ; et ainsi de suite, jusqu'à épuisement du milieu nutritif. Dans une culture ainsi constituée, le dernier disque mycélien formé est seul vivant. Dans des milieux alimentaires défectueux, la formation de disques peut être enrayée et le mycélium arrivé à la surface se ramifie alors dans les limites du ménisque aqueux et grimpe le long du verre entraînant dans sa croissance une mince pellicule d'eau. Dans la partie centrale du tube, il se forme alors un enchevêtrement de filaments mycéliens immergés. Cette croissance en manchon (sans formation de disques mycéliens) indique le plus souvent une alimentation sulfurée défectueuse (qualitativement ou quantitativement).

L'épaisseur des filaments mycéliens varie quelque peu suivant la composition du milieu. Chaze signale un amincissement des filaments en présence de fortes concentrations de

peptones. De notre côté, nous avons observé un amincissement toutes les fois que le milieu contenait des substances tant soit peu toxiques.

MESURE DE L'ACCROISSEMENT. — Comme son titre l'indique, le présent travail est essentiellement une étude d'ordre qualitatif : il ne contient ni données sur le rendement gravimétrique ou énergétique des cultures, ni mesures quantitatives de la consommation des aliments ; il ne contient pas, non plus, d'analyse chimique des produits de métabolisme. Nous avons étudié, par contre, les conditions de culture et la composition du milieu nécessaire au développement du champignon. Un premier résultat de ce travail sera donc de classer les substances chimiques (carbonées, azotées et sulfurées) en corps assimilables et non assimilables. Or, nous verrons par la suite que le pouvoir de synthèse de *Saprolegnia* vis-à-vis d'un élément donné (par exemple, de l'azote) n'a pas une valeur fixe, mais varie en fonction de la *qualité alimentaire* des autres éléments trophiques (par exemple, de celle du carbone ou du soufre). Il est donc indispensable de pouvoir se faire une idée de la valeur *qualitative* des corps étudiés. La qualité de l'aliment est donnée par la vitesse de la croissance du mycélium en sa présence. Pour l'évaluer, nous avons mesuré l'accroissement linéaire global du mycélium immergé. En effet, dans les milieux favorables, les filaments mycéliens s'allongent parallèlement et à chaque moment donné arrivent tous au même niveau. La hauteur de ce niveau, à partir de la base du tube, peut être mesurée à un demi-millimètre près. L'élévation du niveau mycélien en vingt-quatre heures à la température du laboratoire représente « l'accroissement journalier » dans les conditions données. En réalité le mycélium mort de la base du tube se tasse progressivement ; on s'en aperçoit lorsque la croissance du champignon s'arrête pour une raison ou pour une autre : le niveau supérieur du mycélium s'abaisse alors progressivement (de 2 millimètres en vingt-quatre heures environ) ; l'accroissement journalier, tel que nous venons de le définir, ne représente donc, en réalité, qu'un accroissement apparent. Cependant, dans un milieu invariable, cet accroissement est sensiblement constant d'un bout à l'autre de la montée du

mycélium. Réciproquement, toute variation dans l'accroissement journalier traduit, soit une variation intrinsèque (par exemple, une adaptation), soit une variation extrinsèque (épuiement de l'aliment, accumulation de produits de déchet). Cette méthode permet donc de suivre pas à pas toute l'évolution d'une culture.

Malheureusement, la valeur de l'accroissement journalier ne saurait constituer un critérium ni général, ni constant. D'abord, la densité du mycélium peut varier d'un milieu à l'autre. D'où la nécessité de ne comparer l'accroissement qu'à dans des cultures de densité semblable. D'autre part, dans un grand nombre de milieux défectueux, le mycélium se développe généralement sous forme de filaments isolés, peu ramifiés et ne constituant pas de niveau supérieur net. Un phénomène analogue peut prendre place parfois dans les milieux riches : quelques filaments isolés parcourent rapidement la colonne liquide jusqu'en haut, et le mycélium se développe en surface ; ce « développement explosif » rappelle une véritable mutation, comparable dans une certaine mesure à la mutation pléomorphique des dermatophytes, étudiée par Sabouraud (1929), puis par Langeron et ses collaborateurs (1930). Cependant, la mutation « explosive » de *Saprolegnia* est parfaitement réversible, dans les limites d'une même souche et d'une même culture ; cette mutation paraît résulter du jeu de facteurs impondérables, dont la nature nous échappe à l'heure actuelle. Naturellement, les tubes présentant un développement « explosif » ne peuvent servir à la mesure de l'accroissement journalier. Enfin, les potentialités physiologiques d'une souche donnée ne sont pas immuables ; en dehors de tout phénomène d'adaptation, ces potentialités peuvent subir des fluctuations pour ainsi dire spontanées. L'accroissement journalier n'a donc de valeur que dans le cadre d'une même expérience, pour la comparaison entre le développement de cultures-sœurs (ensemencées à partir d'un même tube). Et cependant, malgré toutes ces restrictions, la méthode « altimétrique » rend de grands services, lorsqu'il s'agit de suivre l'évolution d'une même culture en fonction des changements du milieu, ou pour comparer le développement du champignon en présence d'une substance donnée avec le développement dans un milieu témoin. Nous verrons plus

loin le parti qu'on peut tirer de la mesure de l'accroissement journalier.

Notons que la croissance du mycélium de *Saprolegnia* sous l'eau ne suit pas une courbe logarithmique, mais une ligne droite, étant donné que cette croissance est uniquement terminale, les extrémités des filaments mycéliens étant seules vivantes.

Sur les graphiques joints à ce mémoire seront portées les hauteurs des mycéliums, mesurées de vingt-quatre heures en vingt-quatre heures et rapportées à un même point zéro, correspondant au niveau des cultures au moment du départ.

PASSAGE D'UN RÉGIME ALIMENTAIRE A UN AUTRE. — Pour passer d'un milieu de composition donnée à un autre milieu de composition différente, le mycélium est d'abord repiqué au moins trois fois de suite sur le nouveau milieu gélosé. À chaque fois un petit fragment de mycélium sur gélose, prélevé à la partie supérieure du tube, estensemencé dans l'eau de condensation du tube suivant. Ces trois repiquages préliminaires, qui nécessitent environ un mois, assurent à la fois l'élimination de traces de l'ancien milieu nutritif et, généralement, une adaptation au nouveau régime suffisante pour que la nutrition du champignon puisse être étudiée en milieu liquide. L'adaptation en question se manifeste par un départ de plus en plus rapide et par un accroissement de plus en plus régulier des cultures sur gélose. Après ensemencement en milieu liquide, le départ des cultures n'est immédiat qu'en présence de peptones ou d'un mélange d'acides aminés; dans les milieux de composition plus simple, il existe toujours un certain temps de latence (jusqu'à trois jours), qui est en général d'autant plus prolongé — pour un régime donné — que la solution nutritive est plus concentrée, donc, dans certaines limites, plus cette solution se révèle favorable par la suite (1). Un autre effet assez général de la concentration du liquide alimentaire consiste en une régularisation de l'accroissement : plus le milieu est concentré, moins les écarts sont grands entre les hauteurs des mycéliums dans une même série de cultures (fig. 1 et 2).

(1) Cette sorte de freinage au départ est avant tout influencée par la concentration du milieu en électrolytes. La figure 2 nous offre un exemple typique de ce phénomène en fonction de la concentration en acétate d'ammonium.

Dans un liquide nutritif incomplet, les impuretés introduites avec le fragment de gélose permettent une certaine *croissance résiduelle* du mycélium. Le graphique de l'accroissement journalier sera représenté alors par une courbe caractéristique permettant de suivre l'épuisement de l'aliment déficient. Une fois cette croissance résiduelle arrêtée, l'addition de l'aliment manquant permettra la reprise du développement normal des cultures. *Ce double phénomène : arrêt du développement en l'absence d'un corps ; renouveau de développement après adjonction du même corps, indiquera que le corps envisagé est indispensable au développement du champignon.* Naturellement, des expériences de contrôle doivent indiquer que ce corps agit directement.

POUVOIR DE SYNTHÈSE MAXIMUM ET VARIATIONS DU POUVOIR DE SYNTHÈSE. — Nous avons dit que le pouvoir de synthèse de *Saprolegnia* vis-à-vis d'un élément donné (par exemple, du soufre) dépendait de la qualité trophique des autres corps présents dans le milieu (sources de carbone et d'azote). Nous appellerons « pouvoir de synthèse maximum » vis-à-vis d'un élément donné (par exemple, de l'azote) le pouvoir d'assimilation de cet élément dans les meilleures conditions réalisées en ce qui concerne l'assimilation des autres éléments étudiés (carbone et soufre). Si par suite du remplacement d'un composé chimique carboné, azoté ou sulfuré, dans les conditions d'assimilation optima, par un autre composé carboné, azoté ou sulfuré, la croissance s'arrête, mais une adjonction du corps remplacé fait repartir les cultures, nous dirons que, dans les conditions données, le corps remplaçant n'est pas assimilé ; si, au contraire, l'adjonction du corps remplacé ne suffit pas pour faire repartir les cultures, nous dirons que, dans les conditions données, le corps remplaçant est toxique.

Dans les chapitres suivants, nous envisagerons, d'une part, le pouvoir de synthèse maximum de *Saprolegnia*, d'autre part, les variations du pouvoir de synthèse en fonction des différentes substances trophiques. Dans ce but, nous ferons varier indépendamment les sources de carbone, d'azote et de soufre. Nous verrons que ce n'est pas toujours possible.

Disons tout d'abord que les peptones constituent un aliment organique complet. Chaze cultivait sa souche dans des solu-

tions de peptone de 1 p. 100 à 5 p. 100 dans l'eau distillée. On peut obtenir des rendements semblables avec des solutions de peptone de 0,5 à 0,1 p. 100, en additionnant le milieu de substances minérales. Le degré d'hydrolyse des peptones n'a pas d'effet sur la facilité de leur assimilation : nous avons obtenu des accroissements journaliers semblables en présence de peptone Chapoteau, de « peptone pepsique de muscle de bœuf », de « peptone pancréatique très aminée » (Vaillant) ou d'« éreptone ».

LE FACTEUR ACIDITÉ. EVOLUTION DU pH DES CULTURES. — Le pH des milieux de culture a été mesuré par voie colorimétrique (indicateurs de Clark et Lubs). L'expérience montre que l'acidité d'une même culture en milieu liquide est différente à des hauteurs différentes. Pour mesurer le pH au niveau où s'effectue la croissance du mycélium, nous procédons de la façon suivante : une pipette effilée chargée d'une solution indicatrice est introduite jusqu'au fond du tube de culture, puis retirée doucement le long de la paroi, de façon à ce que le liquide indicateur s'en échappe progressivement ; il se forme ainsi une trainée verticale de liquide coloré ; quand la diffusion de ce liquide est suffisante, on obtient la gamme entière des valeurs de pH dans toute la hauteur de la colonne liquide. Naturellement, il faut maintenir le tube vertical pendant toutes ces opérations et éviter soigneusement toute cause pouvant provoquer la convection des différentes couches de la solution.

Les limites du pH de départ des cultures dépendent de la constitution du milieu : de nombreuses substances (par exemple, des sels minéraux) dont l'action ne se fait pas sentir au voisinage de la neutralité exercent un effet inhibiteur sur le développement à des valeurs de pH trop élevées ou trop basses. Dans les meilleures conditions que nous ayons pu réaliser (en milieux peptonés), les valeurs limites du pH de départ correspondent approximativement à 4,4 — 4,6 du côté acide et à 8,5 — 8,8 du côté alcalin.

En présence de sels (phosphates, acétates), nous avons observé une élévation de la limite inférieure à $pH = 5,5$ et un abaissement de limite supérieure à $pH = 8,0$. Etant donné que le champignon peut modifier dans une large mesure le pH du milieu,

l'évaluation du pH initial doit être effectuée au moment même du départ des cultures, au point précis où le mycélium se développe.

En présence de peptones comme seul aliment organique, le pH des cultures (quelle que soit sa valeur initiale) tend d'abord vers la neutralité; puis il s'élève, dans les cultures âgées, jusqu'à des valeurs de $pH = 7,6 - 7,8$. En présence d'un petit nombre d'acides aminés ou d'un amino-acide unique, l'élévation de pH est plus marquée et peut atteindre des valeurs de $8,2 - 8,4$. Dans ce dernier cas, l'élévation de pH varie en fonction du rapport C/N de l'acide aminé présent. L'adjonction d'une source de carbone supplémentaire (glycérine) permet au champignon de maintenir le milieu de culture à $pH = 6,9 - 7,1$. Par contre, il suffit d'ajouter au milieu une petite quantité d'un sucre fermentescible, pour que le pH tombe rapidement. Cette chute du pH est plus rapide en présence d'un acide aminé ou d'un sel ammoniacal qu'en présence de peptones. Tant que le milieu n'a pas atteint un pH de 5,5 environ, cette acidification n'a pas de répercussion sur l'accroissement du mycélium. Au delà de ce point, la croissance se ralentit progressivement. Si le pH atteint la valeur limite de $pH = 4,4 - 4,6$, l'accroissement devient nul; l'acidification s'arrête alors elle aussi. Si à ce moment on alcalinise légèrement le milieu, la culture repart et le pH redescend progressivement jusqu'à la valeur critique de $4,4 - 4,6$. L'expérience montre que l'arrêt du développement tient bien à la réaction du milieu et non point à l'épuisement d'une substance alimentaire indispensable. Mais il suffit que le mycélium atteigne dans sa croissance la surface du liquide, pour que les conditions soient tout aussitôt complètement modifiées: un disque mycélien se forme aussi rapidement que si le milieu était neutre; en même temps, le pH du milieu remonte. En déposant de toutes petites gouttes de solutions indicatrices à la surface du disque, on s'aperçoit qu'elle présente une réaction neutre ou alcaline (jusqu'à $pH = 8,0$). La physiologie du champignon est donc très différente suivant que le mycélium se développe sous l'eau ou en surface. Il est vraisemblable que l'acidification du milieu résulte d'une fragmentation fermentative des sucres fermentescibles par le mycélium immergé; le mycélium émergé consommerait les acides organiques précé-

demment formés. Cette hypothèse est corroborée par le fait que, dans les milieux exempts de sucres fermentescibles, on ne constate point cette forte différence de pH au niveau du disque émergé et dans le liquide sous-jacent (1).

En résumé, en présence d'un sucre fermentescible (et quelle que soit la source d'azote, le mycélium immergé n'est capable que d'une acidification du milieu; en présence d'acides aminés comme source unique de carbone et d'azote, il n'est capable que d'une alcalinisation; enfin, il est susceptible d'une équilibration bilatérale du pH en présence d'acides aminés et d'une source de carbone indépendante, non fermentescible (comme la glycérine), ou en présence de peptones.

NUTRITION CARBONÉE.

Les corps carbonés (glucides, acides organiques) ont été étudiés à des concentrations de 0,45 à 5 p. 1.000. Pour l'étude de l'acidification du milieu la teinture de tournesol a été utilisée dans les expériences préliminaires; les indicateurs de Clark dans les expériences plus précises.

Les différentes peptones de muscle constituent, nous l'avons dit, un aliment organique complet pour *Saprolegnia* sp. L'adjonction de glucides à un milieu peptoné à 1 — 10 p. 1.000 n'augmente pas visiblement l'accroissement journalier. Par contre, l'évolution du pH du milieu peut être profondément modifiée. Un petit nombre de glucides seulement sont fortement attaqués, avec production d'acides libres (+, glucides fermentés; —, glucides non fermentés) :

Polyols	Glycérine . .	—	Mannite . . .	—	
Monosaccharides . .	Glucose . . .	+	Lévilose . . .	—	Galactose . . —
Disaccharides . . .	Maltose . . .	+	Saccharose . .	—	Lactose . . . —
Polysaccharides . .	Dextrine . . .	+			

(1) On sait qu'un grand nombre de microorganismes cultivés en présence de glucides fermentescibles donnent lieu à une « alcalinisation secondaire » du milieu qui fait suite à l'acidification du début. Bach (1923) considère cette alcalinisation comme étant due à un dégagement d'ammoniaque, résultant de la nutrition de l'organisme aux dépens de sa propre substance après épuisement de l'aliment carboné. Une explication analogue s'appliquerait difficilement au cas de *Saprolegnia* étant donné que : 1° l'alcalinisation prend place immédiatement après la formation du premier disque mycélien, alors que le champignon est en pleine croissance ; 2° elle se limite au voisinage immédiat

Nous voyons que seuls le glucose et ses polymères purs (maltose, dextrine) sont fermentescibles. Cependant, les autres glucides sont également consommés, ce qui apparaît nettement quand la peptone est remplacée par un amino-acide unique. C'est alors qu'apparaît aussi la qualité alimentaire inégale des différents glucides. Suivant la qualité alimentaire de l'acide aminé, on obtient alors un accroissement moyen ou bon en présence de glucides fermentescibles ; un accroissement médiocre ou nul en présence de glucides non fermentescibles. Cependant, ces derniers sont consommés : si la source d'azote est représentée par un amino-acide favorable (alanine), l'accroissement journalier est plus élevé en présence d'un glucide non fermentescible qu'en son absence ; d'autre part, en présence d'un glucide non fermentescible et d'un acide aminé le champignon acquiert le pouvoir de maintenir le milieu à $pH = 6,9 - 7,1$ (fig. 1).

En présence d'un amino-acide peu favorable (glycocolle), les sucres fermentescibles deviennent indispensables au développement (voir plus bas).

L'acidification du milieu en présence d'un sucre fermentescible n'est pas causée par un déséquilibre dans la concentration totale du milieu en carbone et en azote ; ainsi, l'adjonction de 0 gr. 45 de glucose par litre à un milieu contenant 1 gr. 35 d'alanine [ce qui a pour effet de créer un rapport de N total sur C total de 1 : 4 atomes environ] (1) suffit pour provoquer une acidification régulière du milieu ; si, dans ces conditions, le pH atteint la valeur critique de 4,4 à 4,6, la croissance s'arrête, sans que l'organisme puisse neutraliser l'acide formé en mettant en liberté l'ammoniaque de l'alanine. La marche de la culture est la même en présence d'une dose double de sucre et d'alanine.

Les acides organiques (acétique, lactique, pyruvique, succinique, tartrique, citrique), sous forme de sels de Na ou de NH_4 , constituent des aliments carbonés médiocres.

de ce disque ; le fond du tube, chargé de mycélium mort, restant acide ; 3° elle est indépendante (dans les limites étudiées) de la concentration du milieu en glucide et a lieu bien avant l'épuisement de l'aliment carboné.

(1) Ce rapport est donné par le nombre total d'atomes-grammes de l'azote contenu dans l'alanine et la cystéine du milieu, divisé par le nombre total d'atomes-grammes du carbone contenu dans le glucose, l'alanine et la cystéine.

Un mélange de plusieurs amino-acides appartenant à des séries différentes constitue une bonne source de carbone (accroissement journalier de 5 à 6 millimètres). Par contre,



FIG. 1. — Croissance de *Saprolegnia* sp. en alanine + cystéine avec des doses variables de glycérine.

Dans chaque série de 6 cultures sont indiquées les valeurs maxima et minima des hauteurs du mycélium, et l'espace compris entre ces valeurs limites est hachuré. A la fin sont indiquées les valeurs de pH dans les trois milieux au septième jour (pH initial = 6,9).

Hachures horizontales : pas de glycérine ; hachures verticales discontinues : glycérine à 0,1 p. 100 ; hachures verticales continues : glycérine à 0,5 p. 100. C + A + C, valeur moyenne de la croissance du mycélium en présence de glucose + alanine + cystéine (accroissement journalier moyen de 9,36).

quelques-uns seulement des amino-acides pris isolément sont susceptibles d'assurer à eux seuls l'alimentation carbonée de

Saprolegnia : l'alanine, la cystéine, l'histidine, la phénylalanine donnent de bons résultats (accroissement journalier supérieur à 5 millimètres) ; l'asparagine donne des résultats médiocres ; le développement est fortement retardé en présence de glucosamine ; en présence de leucine, les résultats sont très mauvais ; enfin, le développement est nul en présence d'acide aspartique, de valine, de glycocolle ou de sarcosine.

NUTRITION AZOTÉE.

Pour comparer la qualité alimentaire de différents composés azotés, il faudrait se servir de solutions de ces corps à des concentrations telles que la quantité d'azote par litre soit toujours la même. Or, lorsqu'il s'agit de composés organiques, la même quantité d'azote correspond pour chaque corps donné à une quantité très différente de carbone assimilable, ce qui crée, pour des conditions d'assimilation azotée comparables, une alimentation carbonée très différente. On pourrait ramener la concentration totale en carbone aux mêmes taux en ajoutant des glucides, mais l'expérience montre que les conditions d'assimilation sont tout aussitôt modifiées. Pour comparer la qualité alimentaire des composés azotés organiques, il est donc nécessaire d'effectuer au moins deux séries d'expériences : dans l'une, c'est la concentration totale en N qui sera constante ; dans l'autre, la concentration globale des corps azotés étudiés. Heureusement, une concentration de 2 milli-atomes de N assimilable suffit pour assurer un développement normal et complet des cultures, et entre cette concentration et les concentrations toxiques (généralement beaucoup plus élevées) il existe un palier, dans les limites duquel l'accroissement journalier est sensiblement constant pour chaque corps donné et indépendant de la concentration de ce corps.

L'étude du pouvoir de synthèse maximum vis-à-vis de l'azote doit être faite, nous l'avons dit, dans des conditions optima d'alimentation carbonée et sulfurée. Ces conditions sont réalisées en présence d'un sucre fermentescible comme source de carbone et de cystine (ou de cystéine) comme source de soufre. Étant donné que la cystine contient elle-même de

l'azote, on est obligé de procéder par une méthode indirecte. Si, en présence d'une source supplémentaire d'azote assimilable, une dose de 0 gr. 05 de cystéine par litre de milieu assure un développement normal et complet des cultures, cette même quantité de cystéine ne contient qu'une quantité d'azote suffisante pour permettre au mycélium de s'élever à une hauteur de 3 à 4 cent. 5 au-dessus du fond du tube. Nous considérerons dans les conditions données comme assimilés tous les corps azotés qui assureront un développement complet des cultures en présence de 1 gramme de glucose et de 0 gr. 05 de cystéine par litre; comme non assimilés, dans les conditions données, tous les corps azotés dont la présence n'empêchera pas l'arrêt des cultures à une hauteur de 3 à 4 cent. 5 au-dessus du fond. Pratiquement nous opérons dans des conditions telles que l'azote de la cystéine constitue de $1/20$ à $1/40$ de l'azote total contenu dans le milieu.

Sur les graphiques, en portant le temps de culture en abscisses et la hauteur du mycélium en ordonnées, on obtient deux types de courbes (fig. 2) : si le corps étudié peut servir de source d'azote, on observe une montée régulière et continue de mycélium; autrement, la courbe atteint un maximum, puis redescend lentement, comme en présence de cystéine comme seule source d'azote. Étant donné qu'une acidification du milieu peut également provoquer une diminution progressive de l'accroissement journalier, il est nécessaire de vérifier dans ces derniers cas : 1° qu'une neutralisation du milieu ne suffit pas pour faire répartir les cultures; 2° que l'adjonction d'une quantité suffisante d'un corps azoté assimilable permet un développement normal.

Sont assimilés en présence de glucose et de cystine : les acides aminés : glycocolle, alanine, sérine, valine, leucine, cystine (ou cystéine), arginine, lysine, acide aspartique et asparagine, acide glutamique, glucosamine, phénylalanine, tyrosine, tryptophane, proline, histidine; l'ammoniaque (sous forme de sels organiques); l'urée.

Ne sont pas assimilés dans les mêmes conditions : la sarcosine, l'acétamide, la triéthanolamine (acétate), l'acide nitrique (sel de K).

Nous donnerons à titre d'exemple les courbes d'accroisse-

ment linéaire du mycélium en présence de doses variables de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ (fig. 2).



Fig. 2. — Croissance de *Saprolegnia* sp. en glucose + cystéine avec des doses variables d'acétate d'ammonium.

Dans chaque série de 6 cultures sont indiquées les valeurs maxima et minima des hauteurs du mycélium, et l'espace compris entre ces valeurs limites est hachuré. Afin de ne pas surcharger le tableau, n'ont été portées les hauteurs du mycélium que pour une seule culture témoin — sans acétate d'ammonium. Hachures horizontales : acétate d'ammonium à 0,025 p. 100; hachures verticales : acétate d'ammonium à 0,1 p. 100. G + A + C, valeur moyenne de la croissance du mycélium en présence de glucose + alanine + cystéine (accroissement journalier moyen de 9,36 mm.).

Si nous modifions les conditions de la nutrition carbonée ou sulfurée, le pouvoir de synthèse vis-à-vis de l'azote s'en ressent aussitôt. Ainsi, en présence d'un sucre non fermentescible, le glycocolle ne peut servir d'aliment azoté (voir plus loin). De même, l'azote des sels ammoniacaux organiques ne peut assurer la croissance du mycélium, si la cystine (comme source de soufre) est remplacée par H_2S . En somme, en l'absence de glucose ou de cystine, un nombre restreint d'acides aminés (alanine, phénylalanine, histidine, asparagine, etc.) peuvent seuls assurer l'alimentation azotée de *Saprolegnia*.

NUTRITION SULFURÉE.

Nous avons déjà consacré deux publications à l'énoncé de nos principaux résultats concernant l'étude du pouvoir de synthèse de *Saprolegnia* vis-à-vis du soufre. Rappelons brièvement ces résultats.

En présence de glucose et d'alanine, comme sources de carbone et d'azote, le champignon peut utiliser, comme source de soufre : la cystine (ou la cystéine), l'acide sulfhydrique, l'acide thioacétique, l'acide thiocarbonique, l'acide thiosulfurique (hyposulfureux); il n'utilise pas : l'acide sulfurique, l'acide sulfovinique.

La concentration minima des substances sulfurées permettant le développement du mycélium est indépendante de la concentration toxique de chacune de ces substances.

Concentration en milli-molécule . . .	0,25	0,75	1,5
Cystine (cystéine).	+++	+++	+++
H_2S	+	+++	—
CH_3COSH	++	—	—
$\text{S}_2\text{O}_3\text{H}_2$	+	+	+
CSO_2H_2	+	+	+
SO_4H_3	0	0	0
$\text{SO}_4\text{HC}_2\text{H}_5$	0	0	0

—, toxique; 0, non assimilé; +, assimilé, développement très lent, filaments mycéliens épars; ++, mycélium serré, accroissement journalier moyen de 5-6 millimètres; +++, mycélium serré, accroissement journalier de 8-10 millimètres.

Parmi les corps sulfurés, autres que la cystéine, c'est l'acide sulfhydrique (sous forme de sels alcalins) qui représente l'aliment de beaucoup le meilleur.

Notons que l'acide sulfurique ne peut servir de source de soufre ni en présence d'un mélange d'acides aminés, ni même en présence de polypeptides; ainsi, dans un milieu à la peptone de soie (ne contenant que des traces de cystéine) et en présence de SO_4K_2 , le développement s'arrête, aussitôt épuisée la source de soufre organique. Ce résultat est valable aussi bien pour le mycélium immergé que pour le mycélium aérien. Ainsi, lorsque, dans un milieu à la peptone de soie et au sulfate de K, la quantité de soufre organique est suffisante pour permettre au mycélium de monter à la surface du liquide et de former un premier disque émergé, la croissance s'arrête tout de même et la formation des disques suivants est enrayée.

Dans les limites des concentrations étudiées, la présence de SO_4K_2 a pour seul effet d'entraver la « croissance résiduelle » du mycélium :

« Croissance résiduelle » de *Saprolegnia sp.* en glucose + alanine, sans cystéine et en présence de doses croissantes de SO_4K_2 (premier repiquage en milieu liquide à partir du même milieu gélosé) :

SO_4K_2 en milli-molécules	AGE DES CULTURES		
	2 jours	4 jours	9 jours
—	—	—	—
0,0	±	++	+++±
0,2	±	++	+++±
0,5	0	±	+±
1,0	0	0	+
2,5	0	0	±

Notons enfin que le remplacement de la cystine par d'autres corps sulfurés (comme SH_2) n'est compatible avec le développement qu'en présence d'un sucre fermentescible (comme le glucose) et d'une source d'azote favorable (comme l'alanine). En présence d'autres sources de carbone et d'azote, la cystine (ou la cystéine) constitue la seule forme de soufre assimilable.

CORRÉLATIONS ENTRE LE POUVOIR DE SYNTHÈSE DE *Saprolegnia* *sp.*
VIS-A-VIS DES TROIS ÉLÉMENTS ÉTUDIÉS (C, N, S).

La présence d'un sucre fermentescible, superflue dans un milieu peptoné à 1 ou 5 p. 1.000, devient favorable au développement en présence de peptone à 0,5 p. 1.000, ou si l'azote est fourni sous forme de cystéine ou d'alanine: elle devient indispensable si l'azote est fourni sous forme de glycocolle.

Croissance de *Saprolegnia* *sp.* en présence de glucides à 3 p. 1.000 et de glycocolle à 1 p. 1.000, ou de peptone à 0,5 p. 1.000; tous les tubes contiennent de la cystine à la dose de 0,05 p. 1.000. O, pas de développement; +, cultures très pauvres, filaments mycéliens épars; ++, cultures normales.

	GLYCOCOLLE	PEPTONE
	—	—
Pas de glucides	0	+
Glycérine	0	+
Mannite.	0	+
Glucose.	+	++
Lévuiose	0	+
Galactose	0	+
Maltose.	+	++
Saccharose	0	+
Lactose	0	+
Dextrine	+	++

La croissance est donc semblable dans un milieu contenant de la peptone et un sucre non fermentescible (lévuiose) et dans un milieu contenant un sucre fermentescible (glucose) et du glycocolle.

La cystine, qui peut être remplacée par une série de corps sulfurés en présence de glucose et d'alanine, devient la source de soufre obligatoire en l'absence de glucose, ou si l'alanine est remplacée par un sel ammoniacal.

Le pouvoir de synthèse du champignon vis-à-vis d'un élément donné dépend donc de la qualité alimentaire des autres éléments présents.

On peut classer les différents composés carbonés, azotés et sulfurés en trois grands groupes suivant leur qualité alimen-

taire pour *Saprolegnia*. Dans chacun de ces groupes, nous n'indiquerons que les principaux représentants :

ASSIMILÉS		NON ASSIMILÉS
Aliments favorables	Aliments médiocres	
<i>Carbone :</i>		
Glucose.	Lévulose, saccharose,	CO ₂
Maltose.	Galactose, lactose,	
Dextrine.	Glycérine, mannite,	
Peptones.	Aminoacides,	
	Acides ternaires.	
<i>Azote :</i>		
Alanine, sérine,	Glycocolle.	NO ₃ H
Phénylalanine.	Urée.	
Cystine (cystéine).	Ammoniaque.	
<i>Soufre :</i>		
Cystine (cystéine).	Acide sulfhydrique.	SO ₄ H ₂
	Acide thioacétique.	
	Acide thiocarbonique.	
	Acide thiosulfurique.	

Il est évident que si l'un des trois éléments en question est représenté dans le milieu par un composé non assimilable, le développement du mycélium ne pourra avoir lieu. Mais pour que le développement prenne place, il faut, de plus, que le milieu possède une certaine valeur trophique globale définie par la qualité alimentaire de chacun de ses constituants. Si nous désignons les bons aliments carboné, azoté et sulfuré par des majuscules (C, N, S), les mauvais par des minuscules (*c*, *n*, *s*), si nous indiquons un bon développement par ++, un mauvais par + et un développement nul par 0, nous pourrions résumer nos observations dans le tableau suivant :

CNS . . .	++	CNs	+	CnS	+	Cns	0
cNS	+	cNs	0	cNc	0	cns	0

Autrement dit, pour que le développement ait lieu, il faut que deux, au moins, des aliments soient bons.

Naturellement, le schéma ci-dessus est — comme tous les schémas — imparfait : la qualité alimentaire des différents corps réunis dans un même groupe n'est pas identique, et tous les intermédiaires existent entre les composés classés comme « favorables » et comme « aliments médiocres ». Il n'en persiste pas moins cette conclusion générale que le pouvoir de synthèse d'un organisme vis-à-vis d'un élément donné dépend de la qualité trophique des autres éléments nutritifs présents et que l'assimilation d'un composé donné doit être nécessairement étudiée en fonction de l'assimilation des autres corps.

Cette conclusion est en accord avec un certain nombre de données concernant les bactéries. Ainsi, l'on sait que l'assimilation des nitrates par certains microorganismes nécessite la présence de glucides fermentescibles. Dans le présent chapitre, nous avons profité de nos données nouvelles concernant les variations du pouvoir de synthèse de *Saprolegnia* pour présenter cette notion sous forme concise et explicite.

DISCUSSION DES RÉSULTATS.

A la suite d'une étude uniquement qualitative, ne comportant ni dosage des produits consommés, ni mesure du rendement énergétique des cultures, ce serait outrepasser la portée de nos résultats que de nous lancer dans une discussion de nos observations au point de vue chimique. Nous profiterons des faits établis par d'autres pour tenter de coordonner et d'expliquer certaines de nos données.

Le pouvoir de synthèse de *Saprolegnia* en cultures immergées ne saurait être comparé sans réserve à celui des champignons à spores aériennes et qui se développent à la surface des liquides nutritifs. Les conditions d'oxygénation sont, en effet, différentes à la surface du liquide ou en profondeur. Nous avons vu que, dans les cultures immergées et en présence de glucose, le développement du champignon était accompagné d'une acidification rapide du milieu qui pouvait s'expliquer par une formation d'acides organiques aux dépens du sucre. C'est là un caractère d'anaérobiose partielle, qui disparaît aussitôt le mycé-

lium arrivé à la surface du liquide. C'est une notion classique datant de Pasteur.

L'électisme du champignon vis-à-vis de l'aliment glucidique est vraisemblablement lié lui aussi au mode de croissance immergé de *Saprolegnia*. On sait que les moisissures se développent avec des vitesses semblables aux dépens de sucres divers lorsqu'elles sont ensemencées en surface (Terroine et Wurmser, 1922 ; Coupin, 1927 a). Par contre, le développement est moins rapide en présence de polyalcools (Czapek, 1902); la qualité alimentaire de ces derniers serait déterminée par la facilité avec laquelle ils pourraient être transformés en glucose (Kostytschew, 1926). Une différence notable entre la qualité trophique des différents sucres apparaît aussitôt que les conditions d'oxygénation des cellules sont modifiées (déjà dans les graines en voie de germination : Terroine, Trautmann, Bonnet et Jacquot, 1925) ou lorsque le milieu nutritif est défectueux (Molliard, 1918).

Une deuxième particularité physiologique de *Saprolegnia* réside dans la valeur relativement élevée du pH limite inférieure compatible avec son développement ($pH = 4,4 - 4,6$). On sait que la grande majorité des moisissures étudiées peuvent se développer dans des milieux beaucoup plus acides : jusqu'à $pH = 1,2$, dans le cas de *Sterigmatocystis nigra* (Terroine et Wurmser); jusqu'à 2,6 dans celui de *Aspergillus repens* (Bach, 1925).

Robbins (1924) montre, par l'application de méthodes indirectes, que le point isoélectrique de *Rhizopus nigricans* correspond à $pH = 5,0$ et celui de *Fusarium lycoperdici* à $pH = 5,5$; sur milieu solide, le développement de ces espèces peut avoir lieu aussi bien au-dessus qu'au-dessous du pH isoélectrique, mais qu'à ce dernier correspond une vitesse d'accroissement minimum. La transpiration peut être envisagée comme un facteur de la circulation d'eau (et des aliments dissous entraînés) dans le cas d'un mycélium aérien ; ce facteur ne peut intervenir dans le cas d'un mycélium immergé. Si nous observons que l'entrée de l'eau dans les plantes aquatiques (submergées) semble due en grande partie à une osmose électrique (Keller, 1932), et que cette osmose nécessite l'existence d'une charge électrique négative au niveau de la paroi absorbante, il

est permis de supposer que la valeur critique de $pH = 4,4 - 4,6$ correspond au point isoélectrique du mycélium de *Saprolegnia* (1).

Parmi les différents Phycomycètes étudiés (Bach, 1927), *Saprolegnia* se rapproche, au point de vue de son alimentation azotée, des *Rhizopus* et s'oppose aux *Mucors* (non-assimilation des nitrates). Par sa préférence pour certains amino-acides (comparativement aux sels ammoniacaux), *Saprolegnia* se distingue de la majorité des moisissures. Bach (*loc. cit.*) montre (*contra* Czapek, 1901) que, dans le cas d'*Aspergillus repens*, les sels ammoniacaux constituent une source d'azote meilleure que les acides aminés : l'assimilation de ces derniers comporterait le travail supplémentaire de la désamination. L'utilisation de l'ammoniac est un phénomène très général, puisque les vertébrés eux-mêmes peuvent assimiler, à côté d'un taux d'azote « différencié », une certaine proportion d'azote ammoniacal (Terroine, Fleuret et Stricker, 1923). Par contre, on connaît un certain nombre d'organismes capables d'assimiler l'azote d'un amino-acide, incapables d'assimiler l'azote ammoniacal : *Hæmatococcus pluvialis*, *Chlamydomonas agloëformis*, à l'obscurité (A. Lwoff, 1932) ; *Euglena deses*, à la lumière (H. Dusi, 1932). On pourrait se demander si l'énergie dégagée par la désamination exothermique des acides aminés n'était pas utilisée dans ces cas pour la réalisation des synthèses ultérieures. Cependant, Terroine et Bonnet (1926), Terroine, Trautmann, Bonnet et Jacquot (1925) montrent que l'énergie de désamination est perdue pour l'organisme. Il semble donc que de simples considérations de thermodynamique ne permettent pas de prédire la valeur trophique des différents corps azotés pour un organisme donné : si certains organismes (tels qu'*Aspergillus*) présentent une grande tolérance vis-à-vis de l'aliment azoté, « une dégradation physiologique » (2) plus poussée conduit à une spécificité plus grande des sources

(1) L'absorption de l'eau par les moisissures se développant à la surface de liquides fortement acides irait alors à l'encontre du « facteur électrostatique ». Winslow, Falk et Caulfield (1923) trouvent, en effet, par voie électrophorétique, qu'une moisissure, viable à des pH très bas, est chargée positivement, en quoi elle s'oppose à la majorité des organismes étudiés à ce point de vue.

(2) Au sens de A. Lwoff (1932).

d'azote assimilable. C'est peut-être dans une réduction de l'arsenal diastasique de ces organismes qu'il faudrait avec Schœn, (1931) chercher une explication de la spécificité en question.

Au point de vue de son alimentation azotée, *Saprolegnia*, nous l'avons dit, présente une tolérance assez grande, si l'on opère dans des conditions où son pouvoir de synthèse est maximum. Il serait à comparer en cela à certaines bactéries, comme le bacille d'Eberth, qui n'assimile l'azote du glyocolle qu'en présence d'un aliment énergétique approprié.

La clef de la culture de *Saprolegnia* en milieu synthétique était donnée, nous l'avons dit, par l'alimentation sulfurée de cet organisme : un trait caractéristique de sa physiologie consiste dans son inaptitude à réduire les sulfates. Ce caractère semble jouer un rôle décisif dans la répartition de *Saprolegnia*, champignon aquatique qui ne se développe que sur des animaux morts ou vivants (en présence de cystéine) ou sur des matières organiques immergées en putréfaction à l'abri de l'air (en présence d' H_2S).

Ainsi que l'indique la « loi des minima » de Liebig, les différents éléments chimiques entrant dans la constitution d'un organisme ne peuvent se remplacer l'un l'autre ; il suffit donc que l'un de ces éléments fasse défaut ou soit présenté sous une forme inassimilable pour que le développement de l'organisme soit rendu impossible. Mais, pour que le développement dans un milieu complet puisse avoir lieu, il faut, en outre, que l'énergie totale fournie par les sources énergétiques présentes dans le milieu soit suffisante pour permettre la réalisation de l'ensemble du travail synthétique effectué par l'organisme. Ces considérations pourraient expliquer ce fait qu'en présence d'une même source énergétique (comme le glucose), le pouvoir de synthèse de *Saprolegnia* vis-à-vis d'un élément (comme le soufre) varie en fonction de la qualité alimentaire des autres éléments (comme par exemple, l'azote) ; inversement, en présence d'une source de soufre donnée (cystine), le pouvoir de synthèse vis-à-vis de l'azote variera en fonction de la qualité de l'aliment énergétique (glucide).

On admet à l'heure actuelle qu'entre la consommation du glucose et de son isomère cétonique (lévulose), il ne peut y avoir de différence de principe, mais uniquement une différence

de vitesse : si l'un des sucres est consommé, l'autre, l'est aussi ; l'énergie fournie par la combustion d'une molécule de chacun est sensiblement la même (Emery et Benedict). D'après Lindet (1911) et Molliard (1918), le lévulose ne sert qu'à l'édification de cellules dans des cas où le glucose peut constituer en plus une source d'énergie importante. A la suite de Duclaux, Terroine et Wurmser montrent que l'énergie consommée par un organisme se décompose en une « énergie de croissance » et une « énergie d'entretien ». Il en résulte que la croissance de l'organisme nécessite l'absorption, par unité de temps, d'une quantité d'énergie supérieure à celle qui est utilisée pour son entretien dans les conditions données. S'il en est ainsi, une différence quantitative (vitesse d'oxydation) entre deux isomères peut conduire, dans des conditions déterminées (glycolle, comme source d'azote, cystine, comme source de soufre), à une différence de principe : développement en présence de glucose ; absence de développement en présence de lévulose. Cette explication est d'autant plus plausible que des disaccharides non fermentescibles contenant du glucose (comme le saccharose ou le lactose), et qui sont consommés, donnent les mêmes résultats que le lévulose : à ce point de vue, la présence d'une molécule de glucose libre n'équivaut pas à la présence d'une molécule de saccharose ou de lactose.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES.

Si nous nous figurons les organismes hétérotrophes comme descendant d'ancêtres chlorophylliens hypothétiques, nous pourrions distinguer deux grandes voies suivant lesquelles se déroule cette « dégradation physiologique », autrement dit, la réduction progressive du pouvoir de synthèse :

D'une part, les organismes « spécialistes » (pour employer une expression de Kostytschew), chez lesquels la perte de fonctions est unilatérale, et dont le développement n'a lieu qu'en présence d'un certain nombre de substances bien définies ; un bel exemple dans cette série est donné par les « oxytrophes » de Lwoff (1932), organismes qui ne peuvent effectuer leur nutrition carbonée qu'aux dépens d'acides gras inférieurs à chaîne linéaire contenant de préférence un nombre pair de

groupements CH_2 . L'oxytrophie coïncide, dans tous les cas étudiés, avec la persistance de leucoplastes, et il y a lieu de croire, avec Lwoff, que cette relation traduit plus qu'une simple coïncidence.

D'autre part, les organismes « non spécialistes », où la source d'azote organique peut servir en même temps de source de carbone (« haplotrophes » de Lwoff).

Parmi tous les éléments chimiques entrant dans la constitution des êtres vivants, trois corps ne sont assimilés à partir de leurs oxydes qu'à la suite d'une réduction ; ce sont : le carbone, l'azote et le soufre. La dégradation des organismes « non spécialistes » porte, en particulier, sur le pouvoir de réduction de ces trois éléments : une première étape de cette lignée est constituée par des moisissures comme *Aspergillus*, capables de réduire les nitrates et les sulfates et ne se distinguant, somme toute, des végétaux autotrophes que par l'absence de chlorophylle et de plastes : le carbone seul ne peut être assimilé à partir de son oxyde ultime. L'étape suivante est représentée par la majorité des levures, où à l'impossibilité d'assimiler le carbone à partir de CO_2 s'ajoute l'inaptitude à réduire les nitrates.

Ensuite vient une lacune dans la série physiologique, étant donné que la perte du pouvoir de réduction vis-à-vis du troisième élément (soufre), — si tant est qu'elle existe — est masquée — dans les organismes jusqu'ici étudiés — par une dégradation plus profonde de l'assimilation azotée (« haplométatrophie » de Lwoff). Nous trouvons, cependant, une indication favorable à l'idée de cette chute du pouvoir de synthèse vis-à-vis du soufre dans ce fait, démontré par Abderhalden, que la cystine fait partie des amino-acides alimentaires indispensables pour les Vertébrés. Le cas de *Saprolegnia* comble cette lacune en fournissant l'exemple d'un organisme « haplomésotrophe » où la réduction du pouvoir de synthèse porte à la fois sur les trois éléments chimiques nécessitant une réduction : C, N et S. La nutrition sulfurée aux dépens de H_2S est, à ce point de vue, comparable à la nutrition aux dépens de NH_3 , et la nutrition aux dépens de combinaisons organiques du soufre, à celle aux dépens d'azote organique.

Dans sa classification physiologique des microorganismes, A. Lwoff (*loc. cit.*) se base sur les caractères de la nutrition carbonée et azotée et sur la nature de la source d'énergie utilisée par les organismes.

Ces caractères permettent de définir, d'une part : 1, les « prototrophes » (assimilation de l'azote atmosphérique; 2, les « autotrophes » (aliments azoté et carboné minéraux); 3, les « mésotrophes » (synthèse des protides à partir de NH_3 ; aliment azoté : nitrate, sel d'ammonium ou acide aminé; un composé organique est indispensable); 4, les « métatrophes » (un aliment azoté complexe — peptone — est indispensable). D'autre part : 1, les « chimiotrophes » (assimilation de CO_2 grâce à l'oxydation de composés organiques); 2, les « phototrophes » (assimilation de CO_2 grâce à la photosynthèse); 3, les « oxytrophes » (un composé carboné organique indépendant est indispensable quel que soit l'aliment azoté); 4, les haplotrophes » (l'aliment azoté organique peut servir de source carbonée).

La superposition de ces deux séries de caractères permet à Lwoff de définir, par exemple, des organismes « chimioautotrophes », « oxymésotrophes », « haplomésotrophes ».

**Subdivisions du groupe des mésotrophes
dans la classification physiologique des microorganismes
de A. Lwoff.**

PHOTOTROPHES	OXYTROPHES	HAPLOTROPHES
<i>Mésotrophes N — S (non-assimilation de NO_3H et de SO_4H_2) :</i>		
		Haplo-mésotrophes N — S (<i>Saprolegnia sp.</i>).
<i>Mésotrophes — N (non-assimilation de NO_3H) :</i>		
Photomésotrophes N (<i>Euglena anabaena</i>).	Oxymésotrophes N (<i>Polytoma uvella</i>).	Haplo-mésotrophes N (<i>Saccharomyces, etc.</i>).
<i>Mésotrophes sensu stricto (assimilation de NO_3H et de SO_4H_2) :</i>		
		Haplo-mésotrophes s. s. (<i>Aspergillus</i> , <i>Sterigmatocystis</i>).

En tenant compte des potentialités physiologiques des organismes mésotrophes dans les conditions de pouvoir de synthèse maximum, nous pourrions subdiviser ces organismes en trois séries : les *mésotrophes sensu stricto* (assimilation des nitrates et des sulfates); les *mésotrophes N* (non-assimilation des nitrates, assimilation des sulfates); les *mésotrophes N—S* (ni les nitrates, ni les sulfates ne sont assimilés). *Saprolegnia sp.* serait

alors un mésotrophe N—S. On pourrait envisager aussi l'existence de mésotrophes S (non assimilation de sulfates, assimilation de nitrates), mais ce groupe ne trouverait à l'heure actuelle aucun exemple connu.

Les subdivisions ci-dessus peuvent être résumées dans le tableau de la page précédente.

Nous croyons que, dans l'avenir, la liste des organismes rentrant dans la série N—S pourra être allongée aux dépens d'organismes actuellement considérés comme métatrophes. Alors le cas de *Saprolegnia* n'apparaîtra plus aussi isolé.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1925. BACH (Denis). Contribution à l'étude de la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens* de Bary. Influence de la réaction du milieu. Ed. : A. Brulliard, Saint-Dizier.
1927. BACH. La nutrition azotée des Mucorinées. Assimilation de l'ion nitrique. *C. R. Ac. Sc.*, **184**, p. 178.
1925. CHAZE (Jean). Essais de culture pure d'une Saprolégniacee (Diplôme d'Études Supérieures), éd. L. Declume, Lons-le-Saulnier.
1927. COUPIN (Henri). Sur la nutrition carbonée du *Penicillium glaucum* à l'aide de divers composés de la série grasse. *C. R. Ac. Sc.*, **184**, p. 1575.
1933. DUSI (H.). Recherches sur la nutrition de quelques Euglènes. *Annales de l'Institut Pasteur* (à l'impression).
1926. KOSTYTSCHEW (S.). Lehrbuch der Pflanzenphysiologie (I). J. Springer, Berlin.
1930. LANGERON (M.) et MILOCHEVITCH (S.). Morphologie des Dermatophytes sur milieux naturels et milieux à base de polysaccharides. Essai de classification. *Ann. de Parasitol.*, t. VIII, pp. 422 et 465.
1941. LINDET (L.). Sur le pouvoir électif des cellules végétales vis-à-vis du dextrose et du lévulose. *C. R. Ac. Sc.*, **152**, p. 775 et *Ann. Inst. nat. Agron.* (2), **10**.
1932. LWOFF (André), Recherches biochimiques sur la nutrition des Protozoaires. *Monogr. de l'Inst. Pasteur*, éd. Masson, Paris.
1918. MOLLIARD (Marin). Influence de certaines conditions sur la consommation comparée du glucose et du lévulose par *Sterigmatocystis nigra* à partir du saccharose. *C. R. Ac. Sc.*, **167**, p. 1043.
1924. ROBBINS (William J.). Isoelectric points for the mycelium of fungi. *J. gen. Physiol.*, **6**, p. 259.
1929. SABOURAUD (R.). Généralités concernant les Dermatophytes (IV^e). Le problème du pléomorphisme des cultures des Dermatophytes. *Ann. de Dermatol. et Syphil.* (6), **10**, p. 481.
1931. SCHOEN (M.). Problèmes de spécificité dans les processus de fermentation. *Annales de l'Institut Pasteur*, **47**, p. 690.
1926. TERROINE (Emile-F.) et BONNET (R.). Le mécanisme de l'action dynamique spécifique. *Ann. Physiol. et Physicochim. Biol.*, n° 4, p. 488.

1923. TERROINE (Emile-F.), FLEURET (P.) et STRICKER (Th.), L'aptitude comparée des protéiques déficientes et des sels ammoniacaux organiques à la couverture partielle du besoin minimum d'azote. *Arch. intern. Physiol.*, **42**, p. 43.
1925. TERROINE et TRAUTMANN (M^{lle} S.), BONNET (R.) et JACQUOT (R.), L'énergie de croissance (III^e). Rendements énergétiques comparés dans le développement de moisissures sur divers aliments organiques, et mécanisme de l'action dynamique spécifique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **7**, p. 351-(IV^e). Le rendement énergétique des divers glucides dans la croissance des végétaux supérieurs. *Ibid.*, p. 461.
1922. TERROINE et WURMSER (R.), L'énergie de croissance (I^{er}). Le développement de l'*Aspergillus niger*. *Ibid.*, **4**, 519.
1932. VOLKONSKY (M.), Culture de *Saprolegnia* sp. en milieu synthétique. Son alimentation sulfurée. *C. R. Soc. Biol.*, **109**, p. 528. Utilisation de différentes combinaisons du soufre par *Saprolegnia* sp. *Ibid.*, p. 614.
1923. WINSLOW (C. F. A.), FALK (J. S.) et CAULFIELD (M. F.), Electrophoresis of bacteria as influenced by Hydrogen ion concentration and the presence of Sodium and Calcium salts. *J. gen. Physiol.*, **6**, p. 177.

CONTRIBUTION A LA CHIMIOTHÉRAPIE DU PALUDISME

ESSAIS SUR LES CALFATS

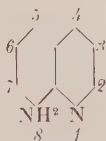
(DEUXIÈME MÉMOIRE)

par E. FOURNEAU, M. et M^{me} J. TRÉFOUEL, DANIEL BOVET,
et M^{lle} G. BENOIT.

Cette étude a pour but de compléter des recherches antérieures et d'en dégager les conclusions en ce qui concerne les relations possibles entre la composition chimique de certaines quinoléines et leur action thérapeutique (1).

Nous ne reviendrons pas ici sur la technique des expériences réalisées sur un oiseau, le calfat (*Padda orizivora*), spontanément infesté par un sporozoaire du groupe des plasmodidés, l'*Hæmoproteus orizivora* : on retrouvera ces indications en se reportant à l'article ci-dessus mentionné (2).

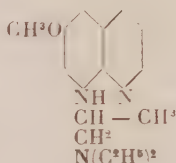
Pour ne pas répéter inutilement les formules, nous dirons ici que toutes les substances dont il est question dans ce travail dérivent de l'aminokinoléine-8 et possèdent par conséquent, le noyau :



(1) Voir mêmes *Annales*, **46**, mai 1931, p. 314.

(2) Il convient toutefois de signaler, ainsi que W. Kikuth vient, dans un travail récent sur l'Atébrine, de le mettre en pleine lumière (*Deut. med. Woch.*, n° 14, 1932) que l'on ne peut substituer le calfat au serin ; il faut employer les deux oiseaux : le calfat est excellent si l'on a simplement en vue l'action sur les gamètes, laquelle semblait être caractéristique des dérivés de la série de la plasmoquine, et si l'on veut comparer sur cette forme de parasites des alcaloïdes de la même série. L'étude d'un composé destiné à guérir le paludisme comporte donc : l'emploi du calfat, du serin, et finalement l'essai clinique sur l'homme. Parmi les corps que nous avons essayés ici, il en est deux ou trois qui sont tout à fait comparables à la Plasmoquine comme action ; l'un est même plus actif chez l'oiseau. Ces substances, en particulier le 574, le 710 et le 852 sont actuellement en expérience sur l'homme. Le 574 a été préparé dans les Laboratoires de Rhône-Poulenc.

reconnu, par les inventeurs de la plasmogéine, comme fondamental (parmi tous ceux qui ont été étudiés) quant à l'action sur le paludisme des oiseaux. Nous n'indiquerons donc que les chaînes fixées à la fonction aminée et les autres fonctions attachées au noyau amino quinoléinique. Nous désignerons ce dernier par les lettres QN. A titre d'exemple, le n° 776 dont la formule développée est :



s'écrit :



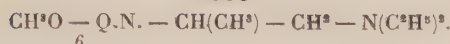
I. — RÉSULTATS SUR UNE SÉRIE DE MÉDICAMENTS DÉRIVANT DE LA QUINOLÉINE.

Dans les tableaux qui suivent, on a utilisé les abréviations suivantes : D. M. T. = dose maxima tolérée, chez le calfat, en gramme, par oiseau. D. M. T./N = le n^{me} de la dose maxima tolérée, injectée par voie sous-cutanée à 5 reprises, cinq jours de suite. Le signe + indique que chez tous les oiseaux mis en expérience (en général 3 oiseaux pour chaque dose), les parasites disparaissent du sang périphérique pendant au moins deux jours. Le nombre de jours pendant lesquels les parasites ne sont pas visibles sous le microscope est indiqué entre parenthèses. Le signe — indique une action nulle, aucun des oiseaux n'ayant été « stérilisé » même temporairement à la suite du traitement subi. Le \pm indique une action incomplète; une partie des oiseaux mis en expérience est débarrassée de ses parasites, ceux-ci ne disparaissent à aucun moment entièrement du sang des autres; la fraction entre parenthèses est le rapport entre le nombre d'oiseaux « stérilisés » et le nombre total d'oiseaux traités.

Les doses sont comptées chez l'oiseau en poids de base libre, mais les substances ont toujours été administrées sous forme de chlorhydrate.

Chaîne à 2 atomes de C.

776



D.M.T.	0,0005
Action, D.M.T./4.	0,000125 + (5 jours).
Action, D.M.T./10	0,00005 + (2 jours).
Action, D.M.T./40	0,0000125 —

Chaîne à 3 atomes de C.

772



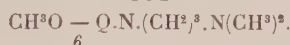
D.M.T.	0,0004
Action, D.M.T./4	0,0001 + (8 jours).
Action, D.M.T./10	0,00004 + (6 jours).
Action, D.M.T./40	0,00001 + (6 jours).
Action, D.M.T./150	0,0000266 —

740



D.M.T.	0,0003
Action, D.M.T./4	0,000075 —

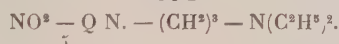
574



D.M.T.	0,001
Action, D.M.T./4	0,00025 + (10 jours).
Action, D.M.T./10	0,0001 + (7 jours).
Action, D.M.T./40	0,000025 + (4 jours).
Action, D.M.T./100	0,00001 + (2 jours).
Action, D.M.T./150	0,000006 ± (1/3)

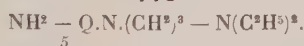
NOYAU QUINOLÉINIQUE SUBSTITUÉ EN C⁵.

774



D.M.T.	0,0016
Action, D.M.T./4	0,0004 —

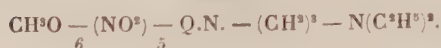
775



D.M.T.	0,0006
Action, D.M.T./4	0,00015 + (8 jours).
Action, D.M.T./10	0,00006 + (4 jours).
Action, D.M.T./40	0,000015 —

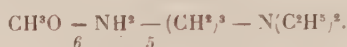
NOYAU QUINOLÉINIQUE SUBSTITUÉ EN C⁵ ET EN C⁶.

782



D.M.T.	0,0012
Action, D.M.T./4.	0,0003 —

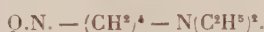
783



D.M.T.	0,0036
Action, D.M.T./4.	0,00009 —

Chaîne à 4 atomes de C.

768



D.M.T.	0,00036
Action, D.M.T./4.	0,00009 + (8 jours).
Action, D.M.T./10	0,000036 + (8 jours).
Action, D.M.T./40	0,000009 —

765



D.M.T.	0,00016
Action, D.M.T./4.	0,00004 + (8 jours).
Action, D.M.T./10	0,000016 + (5 jours).
Action, D.M.T./40	0,000004 —

Chaîne à 5 atomes de C.

747



D.M.T.	0,0002
Action, D.M.T./4.	0,00005 + (10 jours).
Action, D.M.T./10	0,00002 + (4 jours).
Action, D.M.T./40	0,000005 + (2 jours).
Action, D.M.T./150.	0,00000133 —

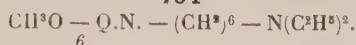
735



D.M.T.	0,0004
Action, D.M.T./4.	0,0001 + (10 jours).
Action, D.M.T./10	0,00004 + (6 jours).
Action, D.M.T./40	0,00001 + (6 jours).
Action, D.M.T./150.	0,0000026 + (5 jours).
Action, D.M.T./250.	0,0000016 ± (1/3)

Chaîne à 6 atomes de C.

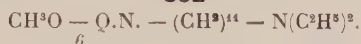
794



D.M.T.	0,0006
Action, D.M.T./10	0,00006 + (10 jours).
Action, D.M.T./40	0,000015 + (6 jours).
Action, D.M.T./150	0,000004 ± (2 jours 2/3).
Action, D.M.T./200	0,000003 ± (2 jours 2/3).

Chaîne à 11 atomes de C.

852



D.M.T.	0,006
Action, D.M.T./4	0,0015 +
Action, D.M.T./10	0,0006 + (10 jours)
Action, D.M.T./40	0,00015 ±

Sur le canari, les résultats des expériences poursuivies avec le 852 se sont montrés exceptionnellement favorables. Ils seront rapportés en détail dans une prochaine note.

II. — RELATIONS ENTRE LA CONSTITUTION CHIMIQUE DES QUINOLÉINES ÉTUDIÉES ET LEUR ACTION THÉRAPEUTIQUE.

De l'ensemble des résultats obtenus et rapportés dans cette étude et de ceux publiés dans le précédent article, un certain nombre de conclusions générales semblent se dégager.

TABLEAU I. — Isomères de la 6-méthoxy-8 (diéthylaminopropylamino) quinoléine. F 710.

(Rôle joué dans l'activité thérapeutique
par la disposition des C. de la chaîne diaminée.)

	$\begin{array}{c} - \text{CH}^2 \\ \text{CH}^2 \\ - \text{CH}^2 \end{array}$	$\begin{array}{c} - \text{CH} - \text{CH}^3 \\ - \text{CH}^2 \end{array}$
	710 D.M.T., 0,0006. C/T = 1/100.	776 D.M.T., 0,0005. C/T = 1/10.
6-méthoxy-8 (diéthylaminopropylamino) quinoléine.		

1° En premier lieu, en portant son attention sur la chaîne diaminée substituée en 8 des quinoléines décrites, on peut

TABLEAU II. — Isomères de la 6-méthoxy-8
(diéthylaminobutylamino) quinoléine.

6-méthoxy-8 (diéthylaminobutylamino)quinoléine.	$\begin{array}{c} -CH^2 \\ CH^2 \\ CH^2 \\ -CH^2 \end{array}$	$\begin{array}{c} -CH-CH^3 \\ CH^2 \\ -CH^2 \end{array}$
	765 D.M.T., 0,00046. C/T = 1/10.	736 D.M.T., 0,00046. C/T = 1/10.

conclure que les composés où cette chaîne est normale sont plus actifs du point de vue antipaludique que les composés chez lesquels il existe une ramification de cette chaîne. Cela ressort très nettement de l'étude des différents isomères à chaîne *n*-propyl ou iso-propyl (tableau I), *n*-butyl ou iso-butyl (tableau II), *n*-amyl ou iso-amyl. Dans ce dernier cas où plusieurs isomères ont été réalisés, on peut observer qu'il existe même une certaine proportionnalité entre l'importance des chaînes latérales et la baisse de l'action chimio-thérapeutique (tableau III).

TABLEAU III. — Isomères de la 6-méthoxy-8
(diéthylaminoamylamino) quinoléine. F 735.

6-méthoxy-8 (diéthyl-aminoamylamino) quinoléine.	$\begin{array}{c} CH^2 \\ CH^2 \\ CH^2 \\ CH^2 \\ -CH^2 \end{array}$	$\begin{array}{c} -CH-CH^3 \\ CH^2 \\ CH^3 \\ -CH^2 \end{array}$	$\begin{array}{c} -CH^2 \\ CH^3-C-CH^3 \\ -CH^2 \end{array}$	$\begin{array}{c} -CH-CH^2-CH^3 \\ CH^2 \\ -CH^2 \end{array}$
	735 D.M.T., 0,0004. C/T = 1/150.	<i>Plasmoquine.</i> D.M.T., 0,00046. C/T = 1/40.	664 D.M.T., 0,00008. C/T = 1/40.	696 D.M.T., 0,00008. C/T = 1/4.

On parviendrait aux mêmes conclusions en comparant, par exemple, le dérivé *n*-propyl (710) avec les composés α -méthyl-propyl (736), α -éthyl-propyl (696), β -diméthyl-propyl (664).

De même, la conclusion à laquelle nous avons abouti dans la première partie de ce travail, au sujet du rôle défavorable joué par une fonction éther-oxyde placée sur la chaîne diaminée n'en constitue qu'un cas particulier.

2° En ce qui concerne le rôle joué par le substituant en posi-

TABLEAU IV. — Influence du substituant en 6 sur le noyau quinoléinique.
6 R 8 (diéthylaminopropylamino) quinoléine.

SUBSTITUANT EN 6 R =	— H	— OH	— OCH ³	— OC ² H ⁵	— CH ³
6 R 8 (diéthylamino- propylamino) quinoléine.	828 D.M.T., 0,0008. C/T = 1/80.	772 D.M.T., 0,0004. C/T = 1/40.	710 D.M.T., 0,0006. C/T = 1/100.	730 D.M.T., 0,0006. C/T = 1/4.	740 D.M.T., 0,0003. Sans action.

tion 6 sur la quinoléine, nous avons pu vérifier les conclusions auxquelles nous avaient conduit notre précédent travail : Le substituant alkoxy n'est pas indispensable, mais il s'est toujours montré favorable à l'action thérapeutique ; la substitution à — OCH³ de — OC²H⁵ paraît toujours défavorable ; dans le seul cas où nous en ayons fait l'expérience, un groupe oxy en position 6 ne modifie pas sensiblement le coefficient chimiothérapeutique : la toxicité et l'action se sont trouvées augmentées dans les mêmes proportions ; enfin la substitution en position 6 du méthoxyl par un méthyle a, dans le seul cas étudié, supprimé toute action parasiticide.

Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus dans le groupe de la quinine, dont de nombreux composés ont été essayés qui ne diffèrent entre eux que par la nature de la substitution réalisée en position 6 sur la quinoléine. Giemsa, Weise et Tropp (1926) ont trouvé que la quinidine agissait mieux sur le canari que la cinchonine. Depuis, les recherches de Goodson, Henry et Macfie, portant également sur le canari, ont abouti au même résultat pour la quinine et la cinchonidine, pour l'hydroquinine et la dihydrocinchonidine, pour la dihydroquinidine et la dihydrocinchonine : c'est chaque fois le dérivé qui possède le substituant méthoxy qui montre aussi le maximum d'activité (1).

(1) Ces résultats concordent avec ceux obtenus par les cliniciens, Mc Gilchrist (1915-1916) ayant montré chez l'homme la supériorité de la quinine sur la cinchonidine, et Fletcher (1923) la supériorité de la quinidine sur la cinchonine. Hegner Shaw et Manwell ont observé pour ces deux paires de substances que le dérivé méthoxylé était plus soluble dans les globules rouges que le dérivé sans substituant en position 5 sur la quinoléine ; ils attribuent à ce fait la différence des actions curatives.

Giemsa, Weise et Tropp (1926) ont également montré que l'éthérisation de la fonction phénolique de la cupréine augmentait fortement l'action, fait que nous avons retrouvé sur les produits étudiés par nous; il en est de même pour l'éthérisation de l'hydrocupréine.

III. — ACTION CHIMIOTHÉRAPEUTIQUE DES 6 MÉTHOXY-8 (DIÉTHYLAMINO *n*-ALKYLAMINO) QUINOLÉINES ET DES 8 (DIÉTHYLAMINO *n*-ALKYLAMINO) QUINOLÉINES.

TABLEAU V.

	692	710	765	735	794	852
Nombre d'atomes de C de la chaîne.	2	3	4	5	6	11
<i>Calfat</i> (1) :						
Dose maxima tolérée	0,0015	0,0006	0,00016	0,0004	0,0006	0,006
Dose toxique	0,002	0,0008	0,0002	0,0005	0,0008	0,008
Dose quotidienne minima curative en cinq jours.	0,00004	0,000006	0,000008	0,0000026	0,000004	0,0006
Indice chimiothérapeutique.	1/40	1/100	1/20	1/150	1/150	1/10
Nombre d'oiseaux stérilisables par 1 gramme de produit	5.000	35.000	25.000	75.000	50.000	350
<i>Toxicité lapin</i> (2) :						
Sous-cutanée	0,040	0,030	0,020	0,025	0,025	0,200
	0,050	0,035	0,025	0,030	0,030	0,300
Intra-veineuse.	0,006	0,0040	0,003	0,006	0,0015	0,015
	0,007	0,005	0,004	0,007	0,002	0,020
C = D. quot. min. cur., calfat/D.M.T. sous-cutanée, lapin	1/4.000	1/5.000	1/2.500	1/9.500	1/6.250	1/333

(1) Dose en grammes par oiseau; voie sous-cutanée, injection dans l'arête dorsale.
(2) Dose en grammes par kilogramme; le premier chiffre représente la dose tolérée, le second, la dose toxique.

Les conclusions générales auxquelles nous sommes arrivés au sujet de la supériorité thérapeutique des composés dont la chaîne diaminée est une chaîne droite, nous ont incités à faire de ces dérivés une étude un peu plus poussée et une comparaison plus précise. Nous avons résumé nos observations en trois tableaux. Le premier d'entre eux (tableau V) concerne les dérivés 6-méthoxy-8-aminoquinoléiniques dont la chaîne diaminée possède 2, 3, 4, 5, 6 ou 11 atomes de C (692, 710, 765, 735, 794, 852). Le second concerne les mêmes dérivés dans lesquels le groupement OCH_3 en 6 est remplacé par H (731, 728,

TABLEAU VI.

	731	728	768	747
Longueur de la chaîne.	2	3	4	5
<i>Calfat (1) :</i>				
Dose maxima tolérée	0,0016	0,0008	0,00035	0,0003
Dose toxique	0,002	0,001	0,0006	0,00040
Dose quotidienne minima curative en cinq jours		0,00001	0,000018	0,000075
Indice chimiothérapeutique		1/80	1/20	1/40
Nombre d'oiseaux stérilisables par 1 gramme de produit		20.000	10.000	25.000
<i>Toxicité lapin (2) :</i>				
Sous-cutanée	0,060	0,050	0,035	0,035
	0,070	0,060	0,040	0,040
Intra-veineuse.	0,016	0,016	0,010	0,010
	0,018	0,018	0,012	0,012
C = D. quot. min. cur. calfat/D.M.T. sous-cutanée lapin.		1/5.000	1/2.000	1/5.000

(1) Dose en grammes par oiseau; voie sous-cutanée, injection dans l'arête dorsale.
(2) Dose en grammes par kilogramme; le premier chiffre représente la dose tolérée, le second la dose toxique.

TABLEAU VII.

	PLASMOQUINE
<i>Calfat (1) :</i>	
Dose maxima tolérée	0,00016
Dose toxique	0,0002
Dose quotidienne minima curative en cinq jours	0,000004
Indice chimiothérapeutique	1/40
Nombre d'oiseaux stérilisables par 1 gramme de produit.	50.000
<i>Toxicité lapin (2) :</i>	
Sous-cutané	0,015
	0,020
Intraveineuse.	0,003
	0,0035
C = D. quot. min. cur. calfat/D.M.T. sous-cutanée lapin	1/4.000

(1) Dose en grammes par oiseau; voie sous-cutanée, injection dans l'arête dorsale.
(2) Dose en grammes par kilogramme; le premier chiffre représente la dose tolérée, le second la dose toxique.

768, 747) [tableau VI]. Un troisième tableau donne les résultats obtenus avec la Plasmoquine et permet ainsi de la comparer avec ces huit produits (tableau VII).

« La dose quotidienne minima curative en cinq jours », qui y figure, est la plus faible dose susceptible de faire régulièrement disparaître (pour une durée de deux jours au minimum) les parasites du sang périphérique de l'oiseau, lorsqu'elle est injectée par voie sous-cutanée cinq jours de suite.

Le coefficient chimiothérapeutique qui figure ici est le quotient :

$$\frac{\text{Dose minima curative en cinq jours}}{\text{Dose minima tolérée (dose unique)}}$$

Du moment que les guérisons définitives ne sont pas possibles, ou du moins très difficilement observables, les rechutes pouvant survenir après une période de temps très longue, cet indice n'a pas une valeur absolue; il n'est valable que dans les conditions d'expérience que nous avons décrites. Pour chaque produit nous avons essayé curativement les fractions suivantes de la dose maxima tolérée : $1/4$, $1/10$, $1/20$, $1/40$, $1/60$, $1/80$, $1/100$, $1/125$, $1/150$, $1/200$, $1/250$, nous arrétant dès que la « dose quotidienne minima curative en cinq jours » est trouvée. Notre coefficient chimiothérapeutique n'a qu'une valeur approximative.

Le nombre d'oiseaux stérilisables par 1 gramme de produit, obtenu en divisant 1 gramme par la « dose totale minima curative en cinq jours » (en gramme) permet de se représenter la quantité absolue de produit nécessaire pour un traitement.

Enfin, ayant remarqué combien les différences de toxicité entre les produits étaient susceptibles de se modifier lorsque l'on passe de l'oiseau au lapin (par exemple, entre le produit 692 et le produit 710, le rapport des toxicités est chez le calfat de $2,5/1$, chez le lapin de $1,3/1$), nous avons calculé ici un indice qui tient compte de l'action curative antiplasmodique chez l'oiseau et de l'action toxique pour le lapin. Nous reconnaissons tout ce qu'a d'arbitraire ce coefficient mixte, mais nous pensons que dans le cas particulier il offre quelque intérêt et que les résultats qu'il fournit permettront mieux que l'indice chimiothérapeutique chez l'oiseau de se représenter les actions relatives des différents produits de cette série chez l'homme.

L'examen de ces chiffres montre que, jusqu'à une certaine limite, l'action curative sur le paludisme aviaire et la toxicité

augmentent avec le poids moléculaire ; toutefois, il ne s'agit pas d'une progression régulière. Il faut remarquer que la diminution du coefficient chimiothérapeutique du produit 765 (tableau V) et du produit 768 (tableau VI) ne provient pas d'une augmentation de leur dose minima curative, mais d'une augmentation de toxicité ; cette dernière peut être attribuée à une augmentation de la valeur anesthésique de ces produits, par rapport à leurs homologues inférieurs et supérieurs, la propriété anesthésique leur conférant une action de poison paralysant.

IV. — ACTION THÉRAPEUTIQUE DES MÉDICAMENTS ACTIFS.

Les mesures d'activité établies sur l'oiseau au cours des recherches qui viennent d'être exposées nous ont conduits à ce résultat que parmi les corps étudiés, deux produits 735 (tableau V) possèdent un indice chimiothérapeutique de $1/150$, sur l'oiseau ; moins toxiques que la plasmoquine sur l'oiseau et sur le lapin (le rapport des toxicités chez ce dernier est de $3/5$ par voie sous-cutanée et $1/2$ par voie intraveineuse), leur dose minima active sur le calfat est plus faible, $1/400$ de milligramme de 735 suffit, administré cinq jours de suite, pour stériliser momentanément un oiseau.

Deux autres produits nouveaux sont encore intéressants au point de vue thérapeutique, ce sont les produits 710 (tableau V), 574 et 728 [tableau VI] (1) qui, bien qu'ayant un indice élevé chez l'oiseau ($1/100$ et $1/80$), sont proportionnellement très peu toxiques chez le lapin.

RÉSUMÉ.

Dans les deux articles précédents, nous sommes arrivés aux résultats suivants, que nous énumérons brièvement ici :

1° L'emploi des *Hæmoproteus*, sporozoaires plasmodiés, parasites des hématies du calfat (*Padda orizivora*), constitue un matériel commode dans les recherches sur la chimiothérapie du paludisme, compte tenu des réserves faites dans la note 2,

(1) Voir pour leurs formules, ces *Annales*, 46, mai 1931, p. 514.

p. 731. Les avantages de cette méthode sur celle qui consiste à utiliser des *Plasmodium*, parasites des canaris, ont été indiqués. Une technique standard a été mise au point qui permettra la comparaison des différents médicaments antipaludiques.

2° Il a été étudié, au moyen de cette technique, une série de dérivés de la 8-aminoquinoléine, substitués en positions 5 et 6 par des radicaux alcoxy, oxy, méthylamino et nitro, et sur l'amine par des chaînes dialcoyl amino alcoyl. 48 produits ont été préparés et essayés, dont 38 ont présenté, *in vivo*, une action parasiticide vis-à-vis des plasmodes. Le coefficient chimiothérapeutique a été déterminé chez l'oiseau et, pour certains d'entre eux, on a recherché la toxicité chez le lapin.

3° Les rapports entre la constitution chimique et l'action antipaludique ont été discutés en détail.

4° Plusieurs des produits étudiés se sont montrés, au point de vue thérapeutique, aussi ou plus actifs que les plus actifs des médicaments utilisés jusqu'à ce jour. Certains d'entre eux sont susceptibles d'être introduits dans la médication antipaludique, en particulier le 574 (6-méthoxy-8 (diméthylamino *n*-propylamino) quinoléine, le 710 (6-méthoxy-8 (diéthylamino *n*-propylamino) quinoléine, le 728 (8-diéthylamino *n*-propylamino) quinoléine, le 735 (6-méthoxy-8 (diéthylamino *n*-amylamino) quinoléine) et le 852.

5° La plupart de ces médicaments de la série quinoléinique s'altèrent assez rapidement et peuvent acquérir une toxicité supérieure à celle qu'ils avaient au moment de leur préparation. C'est là un point qui ne peut être négligé.

6° Plus encore chez les oiseaux que chez les autres animaux de laboratoire, les conditions d'aération, de nourriture, de température, jouent un rôle important et les chiffres que nous donnons dans ce travail n'ont qu'une valeur de comparaison et non une valeur absolue.

7° Nous considérons cette étude comme une simple contribution à l'œuvre remarquable accomplie dans les laboratoires de l'I. G. par W. Schulemann, W. Kikuth et leurs collaborateurs en attendant que ces savants publient un mémoire détaillé sur les substances qu'ils ont étudiées. Elle permet de fixer quelques points intéressants dans le domaine de la plasmoquine et en particulier la grande efficacité de cette dernière qui

n'a été égalée ou surpassée (sur le calfat bien entendu) que par des substances très voisines.

On remarquera encore une fois que, dans le domaine des produits pharmaceutiques comme dans celui des parfums, l'action physiologique maxima est limitée à très peu d'exemplaires d'une même série.

BIBLIOGRAPHIE DES MÉMOIRES I ET II

- ANSCHÜTZ (G.), Ueber den Entwicklungsgang des *Hæmoproteus orizivoræ* sp. nov. *Cbl. f. bakt.*, I Abt. orig., **31**, 1909.
- BOVET (D.), La durée du cycle schizogonique du *Plasmodium præcox*, parasite du canari. *C. R. Soc. Biol.*, **105**, 1930, p. 302.
- BOVET (D.), Recherches sur une nouvelle série d'anesthésiques locaux quino-léniques. Etude pharmacologique de la 6-éthoxy-8- (diéthylamino, 2,2'-diméthyl-propylamino) quinoléine. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **41**, 1931, p. 103.
- COLLIER (A. W.) et KRAUSE (M.), Zur chemotherapie der Halteridien infektion des Reisfinken. *Z. f. Hyg. u. Infektionskr.*, **110**, 1929, p. 522.
- DRENSKY (K.) et HEGNER (R. W.), Periodicity in bird malaria. *Amer. Journ. Hyg.*, **6**, 1926, p. 312.
- EICHHOLTZ (F.), Beitrag zur Pharmakologie des Plasmochins. *Beih. 2. Arch. f. Schiff. u. Trop. Hyg.*, **31**, 1927, p. 89.
- FLETCHER (W.), Notes on the treatment of malaria with the alcaloids of cinchona. *Studies from the Inst. Med. Res. Kuala Lumpur F. M. S.*, n° 18, 1923.
- FOURNEAU (E.), TRÉFOUEL (M. et M^{me} J.), STEFANOPOULOU (G.), BENOIT (M^{lle} G.), LES-TRANGE (M^{me} Y. DE), MELVILLE (K. I.), Contribution à la chimiothérapie du paludisme. Essais sur la malaria des canaris. *Ces Annales*, **44**, 1930, p. 503.
- FOURNEAU (E.), TRÉFOUEL (M. et M^{me} J.), BOVET (D.), BENOIT (M^{lle} G.), Contribution à la chimiothérapie du paludisme. Essais sur les calfats. *Ces Annales*, **46**, 1931, p. 514.
- GIEMSA (G.), WEISE (W.), TROPP (C.), Chemotherapeutische Studien mit Vogel-malaria (*Plasmodium præcox*). *Arch. f. Schiff. u. Trop. Hyg.*, **30**, 1926, p. 334.
- GODOY (A.) et LACOSTE (J. G.), Action d'un noyau de l'oxyaminoquinoléine sur les gamètes et les sporozoïtes de l'*Halteridium* du pigeon. *C. R. Soc. Biol.*, **98**, 1928, p. 617.
- GODDSON, HENRY et MACFIE, Action of the cinchona and certain other alkaloids in bird malaria. *Biochem. Journ.*, **24**, 1930, p. 874.
- HEGNER (R.), SHAW (J. E. H.), MANWELL (R. D.), Methods and Results of experiments on the effect of drugs on bird malaria. *Amer. Journ. of Hyg.*, **8**, 1928, p. 564.
- LAVERAN (A.), Au sujet de l'hématozoaire endoglobulaire de *Padda orizivora*. *C. R. Soc. Biol.*, **52**, 1900, p. 19.
- LAVERAN (A.), De l'existence d'un hématozoaire endoglobulaire chez *Padda orizivora*. *C. R. Soc. Biol.*, **50**, 1898, p. 471.

- Mc GILCHRIST (A. C.), The relative therapeutic value in malaria of the cinchona alkaloids-quinine, cinchonine, quinidine, cinchonidine, quinoidine and two derivatives, hydroquinine and ethylhydrocupreine. *Ind. J. Med. Res.*, **3**, 1915, p. 1.
- MARKS (J. L.), Chemotherapeutische Versuche bei Vogel malaria. *Berl. klin. Woch.*, 1914, p. 1886.
- MASSIA (Ch.), Le 710 et le quiniostovarsol dans le traitement du paludisme à *Plasmodium vivax* et à *Plasmodium precox*. *Bull. Soc. Path. Ex.*, **26**, 1933, p. 433.
- MAZZA (S.), Accion de la plasmochina sobre los gametocitos de infecciones esporádicas por *Hæmoproteus*. *Prensa med. argentina*, **15**, 1928, p. 55.
- MONIER (H. M.), Essai d'un dérivé de la quinoléine (664 Fourneau) dans la malaria expérimentale. *Bull. Soc. Path. Ex.*, **24**, 1931, p. 93.
- MONIER (H. M.), Essais thérapeutiques du 710 Fourneau dans quelques cas de paludisme. *Bull. Soc. Path. Ex.*, **24**, 1931, p. 97.
- MURLENS (P.), Die Behandlung der natürlichen menschlichen Malaria infektionen mit Plasmochin. *Beih. 2, Arch. f. Schiffs. u. Trop. Hyg.*, **30**, 1926, p. 25.
- ROEHL (W.), Die Wirkung des Plasmochins auf die Vogel Malaria. *Beih. 2, Arch. f. Schiffs. et Tr. Hyg.*, **30**, 1926, p. 311.
- SAUTET (J.), Traitement du paludisme par le 710 et le 574 Fourneau associés de nom à la quinine ou au quiniostovanol. *Bull. Soc. Path. Ex.*, **25**, 1932, p. 1.074.
- SCHULEMANN (W.), MEYER (G.), Plasmochin, ein synthetisches gegen die Malaria infektion wirksames chinolin derivat. *Beih. 2, Arch. f. Schiffs. u. Tr. Hyg.*, **31**, 1927, p. 59.
- SERGEANT (E. et E.), Etude sur les hématozoaires des oiseaux. *Ces Annales*, **21**, 1907, p. 253.
- SERGEANT (E. et E.), CATANEL (A.), THENOZ (F.) et SERGEANT (A.), Etude de l'action du 710 sur le Paludisme des oiseaux à *Plasmodium relictum*. *Ces Annales*, **47**, 1931, p. 57.
- TALIAFERRO (L. G.), Infection and resistance in bird malaria, with special reference to periodicity and rate of reproduction of the parasite. *Amer. J. Hyg.*, **5**, 1923, p. 742.
- VAN DEN BRANDEN (F. E.) et HENRY (E.), Nouvelle médication du paludisme par al plasmochine. *Bull. Soc. Path. Ex.*, **20**, 1927, p. 728.

LES VACCINATIONS ANTIRABIKES

A L'INSTITUT PASTEUR EN 1932

par JULES VIALA.

Pendant l'année 1932, 561 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur de Paris : aucune mort n'a été signalée.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées	561
Mort	0
Mortalité p. 100.	0

Le tableau ci-dessous indique les résultats généraux des vaccinations depuis l'origine :

ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100	ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100
1886	2.671	25	0,94	1911	341	1	0,29
1887	2.770	14	0,79	1912	395	0	0,00
1888	1.622	9	0,55	1913	330	0	0,00
1889	1.830	7	0,38	1914	373	0	0,00
1890	1.540	5	0,32	1915	654	1	0,15
1891	1.559	4	0,25	1916	1.388	3	0,21
1892	1.790	4	0,22	1917	1.543	4	0,26
1893	1.648	6	0,36	1918	1.803	3	0,16
1894	1.387	7	0,50	1919	1.813	3	0,16
1895	1.520	5	0,38	1920	1.126	6	0,53
1896	1.308	4	0,30	1921	998	1	0,10
1897	1.529	6	0,39	1922	754	0	0,00
1898	1.465	3	0,20	1923	727	0	0,00
1899	1.614	4	0,25	1924	764	1	0,14
1900	1.420	4	0,28	1925	782	0	0,00
1901	1.321	5	0,38	1926	634	0	0,00
1902	1.005	2	0,18	1927	639	0	0,00
1903	628	2	0,32	1928	671	0	0,00
1904	755	3	0,39	1929	542	0	0,00
1905	721	3	0,41	1930	589	0	0,00
1906	772	1	0,13	1931	531	0	0,00
1907	786	3	0,38	1932	561	0	0,00
1908	524	1	0,19				
1909	467	1	0,21				
1910	401	0	0,00				

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories :

Catégorie A. — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

Catégorie B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Catégorie C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Nous donnons ci-après la répartition entre ces catégories des personnes traitées en 1932 :

ANNÉE 1932	MORSURES à la tête			MORSURES aux mains			MORSURES aux membres			TOTAUX		
	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100
Catégorie A. .	8	0	0	26	0	0	30	0	0	64	0	0
Catégorie B. .	20	0	0	155	0	0	96	0	0	271	0	0
Catégorie C. .	31	0	0	117	0	0	78	0	0	226	0	0
	59	0	0	298	0	0	204	0	0	561	0	0

Les personnes se répartissent de la façon suivante, d'après le territoire sur lequel elles ont été mordues :

France.	560
Algérie	1

Répartition par départements des 560 personnes traitées mordues en France.

Allier.	6	Cantal	3
Ardennes.	5	Cher	3
Aisne.	4	Corrèze.	2
Alpes-Maritimes	10	Côte-d'Or.	3
Ariège	1	Eure	3
Aube.	1	Eure-et-Loir	9
Calvados	4	Finistère	2

Ille-et-Vilaine.	23	Oise	6
Indre.	1	Orne	3
Indre-et-Loire.	9	Puy-de-Dôme.	10
Landes.	1	Pyrénées (Basses-).	3
Loir-et-Cher	1	Rhin (Haut-)	1
Loire (Haute-)	1	Saône-et-Loire	1
Loire-Inférieure.	29	Sarthe	51
Loiret	5	Seine.	226
Lot.	5	Seine-et-Marne	12
Maine-et-Loire	3	Seine-et-Oise.	54
Manche.	4	Seine-Inférieure	23
Marne	1	Sèvres (Deux-)	3
Meurthe-et-Moselle	3	Somme.	3
Meuse	4	Vendée.	2
Morbihan.	7	Vienne (Haute-)	2
Moselle.	1	Yonne	1
Nièvre	5		

Depuis 1911, l'Institut Pasteur a adopté la méthode de conservation en glycérine des moelles atténuées, introduite dans la pratique par A. Calmette.

On se sert de pots-bans d'une contenance de 50 cent. cubes.

Dans chacun, on verse 25 cent. cubes de glycérine neutre à 30° B°.

On stérilise à 120°, pendant vingt minutes.

On laisse refroidir et on introduit dans chaque pot-ban quelques fragments de moelles préalablement desséchées dans un flacon de potasse, d'après la méthode initiale de Pasteur.

Dans chaque flacon contenant la glycérine on met plusieurs fragments de moelle dont la longueur totale peut atteindre 5 centimètres.

On conserve ces flacons à la glacière aux environs de + 4°.

Pour éviter l'infection de la moelle chez les lapins paralysés et agonisants, on place ces derniers dans une enceinte maintenue à 0°.

Sitôt qu'ils sont morts, on extrait la moelle par la méthode d'Oshida, au moyen d'un mandrin métallique nickelé, stérile.

On n'utilise, pour la vaccination des personnes mordues, que des moelles ayant séjourné moins de vingt jours en glycérine, l'expérience ayant démontré que le degré d'atténuation de chaque moelle n'est pas sensiblement modifié pendant les vingt premiers jours. Chaque sujet en traitement reçoit environ, journellement, 2 à 3 millimètres de moelle triturée dans 3 centimètres cubes d'eau distillée stérilisée.

Le virus fixe de passage actuellement utilisé est le même que celui dont on s'est toujours servi depuis la création du service de vaccinations antirabiques, d'abord rue d'Ulm, et ensuite (à partir de 1888) à l'Institut Pasteur.

Il convient de signaler que, depuis le 19 août 1911, les inoculations de passage du virus fixe sont toujours effectuées, non plus avec le bulbe frais de lapin rabique, mais avec le bulbe conservé depuis au moins quarante-huit heures en glycérine à la glacière.

Depuis que cette technique a été adoptée, nous n'avons jamais constaté de modifications dans les délais d'incubation de la maladie après inoculation sous la dure-mère.

Nous reproduisons ci-après le schéma des traitements suivis par les mordus, suivant la gravité de leurs morsures.

Injections antirabiques.

1 ^{er} jour	Moelle de 5 jours	} 3 cent. cubes Morsures légères.
2 ^e —	— 5 —	
3 ^e —	— 4 —	
4 ^e —	— 4 —	
5 ^e —	— 3 —	
6 ^e —	— 3 —	
7 ^e —	— 4 —	
8 ^e —	— 3 —	
9 ^e —	— 2 —	
10 ^e —	— 3 —	
11 ^e —	— 3 —	
12 ^e —	— 2 —	
13 ^e —	— 3 —	
14 ^e —	— 3 —	
15 ^e —	— 2 —	
16 ^e jour	Moelle de 4 jours	} 3 cent. cubes Morsures multiples.
17 ^e —	— 3 —	
18 ^e —	— 2 —	
19 ^e jour	Moelle de 3 jours	} 3 cent. cubes Morsures graves.
20 ^e —	— 3 —	
21 ^e —	— 2 —	
22 ^e jour	Moelle de 3 jours	} 3 cent. cubes Morsures à la tête.
23 ^e —	— 3 —	
24 ^e —	— 2 —	
25 ^e —	— 2 —	

Le Gérant : G. MASSON.

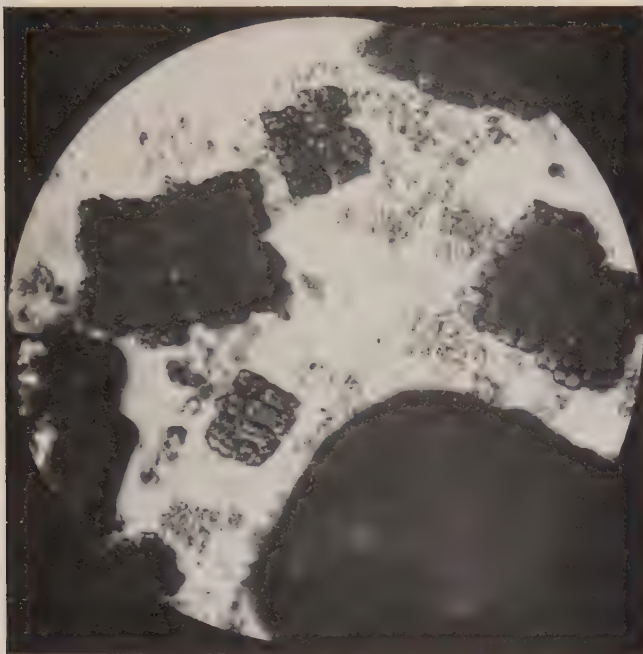


FIG. 1.

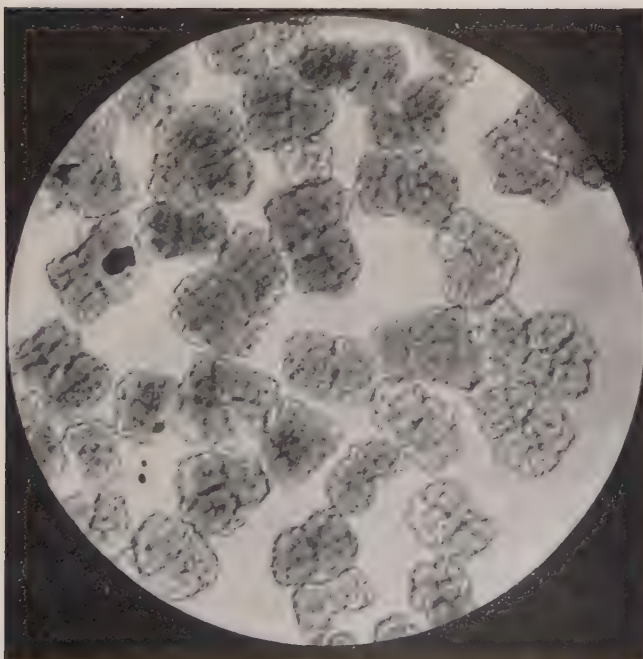


FIG. 2.



FIG. 3.

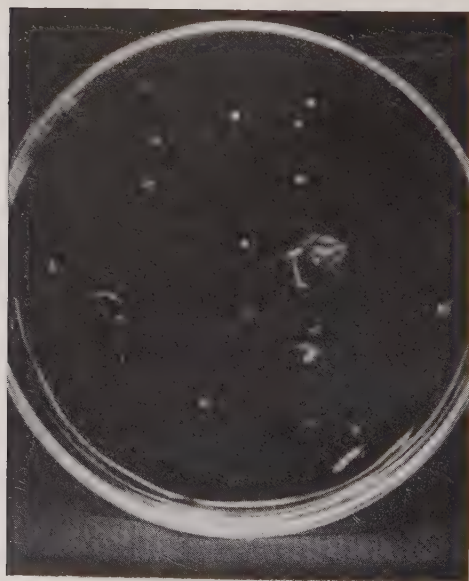


FIG. 4.

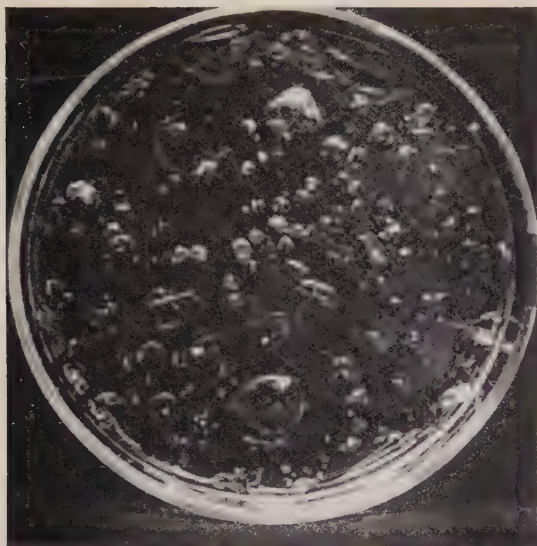


FIG. 5.



FIG. 6.

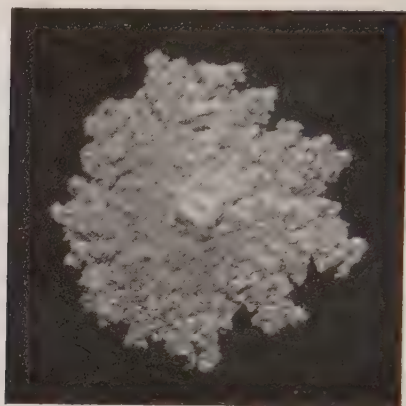


FIG. 7.

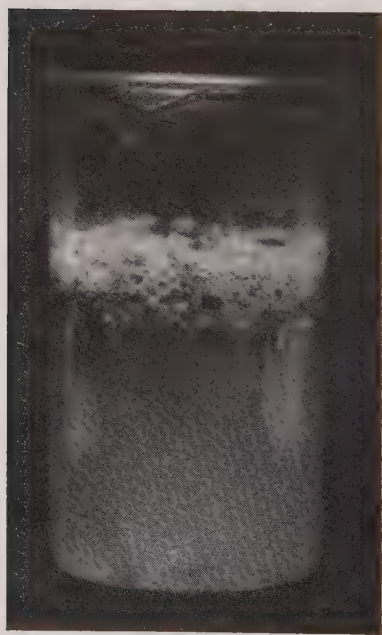


FIG. 8.

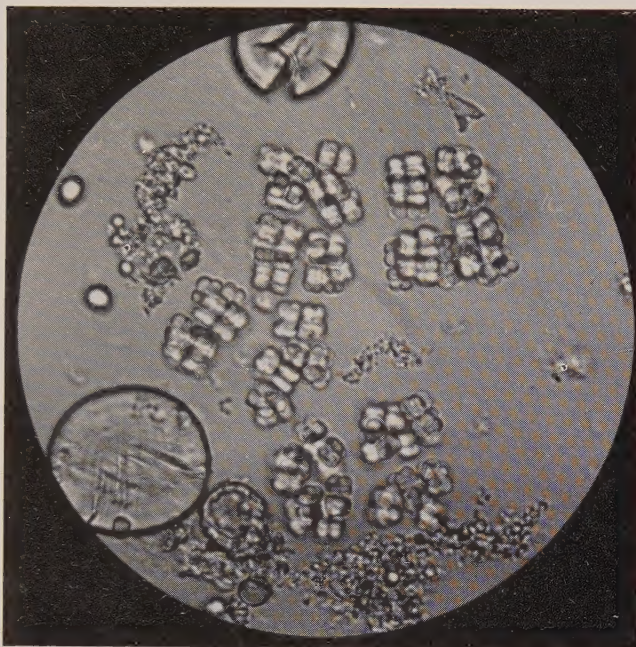


FIG. 9.

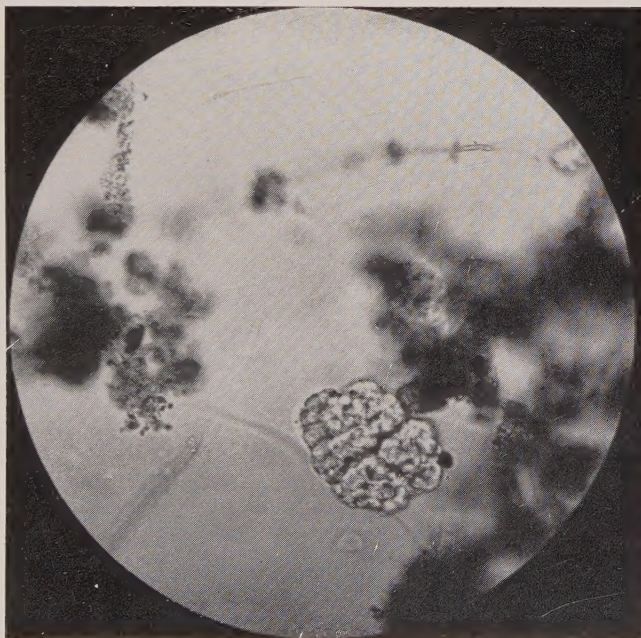


FIG. 10.

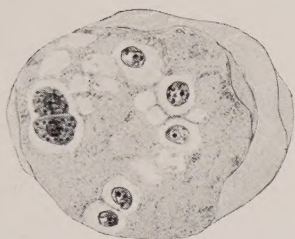


FIG. 1.

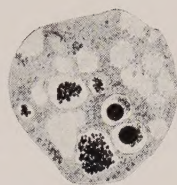


FIG. 2.

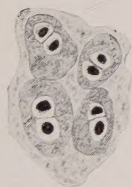


FIG. 3.

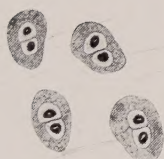


FIG. 4.

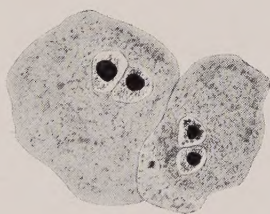


FIG. 5.

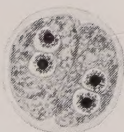


FIG. 6.

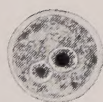


FIG. 7.



P. Waché

FIG. 8.



FIG. 9. 1/1.500

